



THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE PARIS 6

Spécialité :
Sciences de la Vie

Présentée par :
Frédérique MAURICE

Pour obtenir le grade de :
DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Plasticité structurale et émergence d'antibiorésistance à large
spectre : étude d'une aminoglycoside acétyltransférase et
recherche d'inhibiteurs

Soutenue le 19 novembre 2007

Devant le jury composé de :

Andréa DESSEN

Alexis DENIS

Patrice COURVALIN

Germain TRUGNAN

Frédéric DARDEL

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de Thèse

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE PARIS 6

Spécialité :
Sciences de la Vie

Présentée par :
Frédérique MAURICE

Pour obtenir le grade de :
DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Plasticité structurale et émergence d'antibiorésistance à large
spectre : étude d'une aminoglycoside acétyltransférase et
recherche d'inhibiteurs

Soutenue le 19 novembre 2007

Devant le jury composé de :

Andréa DESSEN

Alexis DENIS

Patrice COURVALIN

Germain TRUGNAN

Frédéric DARDEL

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de Thèse

Remerciements

Je voudrais remercier tout particulièrement Frédéric Dardel de m'avoir accueillie chaleureusement dans son équipe. Je le remercie, bien sûr, pour la qualité scientifique de son encadrement, mais aussi pour sa gentillesse et sa bonne humeur me permettant d'effectuer ma thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie également Arnaud Ducruix de m'avoir acceptée dans son laboratoire.

Je remercie Andréa Dessen et Alexis Denis d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail ainsi que Patrice Courvalin et Germain Trugnan d'avoir accepté d'être membre de mon jury.

Je remercie également nos collaborateurs, Ekkehard Collatz et Isabelle Podglajen, du Laboratoire de recherche moléculaire sur les antibiotiques ainsi que Laurent Micouin et son équipe (Guillaume, Thomas et Florence) du Laboratoire de Chimie Thérapeutique.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du LCRB, présent et passé. Mes remerciements s'adressent en tout premier lieu à Carine Tisné qui a été d'un grand soutien tout au long de ma thèse, pour ma recherche et pour la relecture de ce manuscrit mais qui a également contribué fortement au plaisir que j'ai eu à effectuer cette thèse au sein de ce laboratoire, merci pour toutes nos discussions scientifiques ou non ! Je remercie également Isabelle Broutin pour la relecture de ce manuscrit et pour tout ce qu'elle m'a appris en cristallographie. Mes remerciements vont également à toute l'équipe des soirées : Angela, Bili, Daniel, Gilles, Luc, Pierre et Stéphane, merci pour tous les bons moments passés avec vous. Je remercie également Phillipe, Sylvestre ainsi que Claudine et Sabrina pour l'aide qu'ils m'ont apporté en cristallogénèse et cristallographie. Je n'oublie bien sûr pas de remercier Valéry et Franck pour leur aide précieuse en RMN et en "robot" mais surtout pour leur humour faisant de nos repas un grand moment de joie ! Enfin, je remercie tous les autres membres du laboratoire sans exception pour leur disponibilité et leur sympathie.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, en particulier mes parents, ainsi que Benjamin et Jeanne-Marie sans qui je n'aurai pas pu réaliser cette thèse. Merci pour tout !

CHAPITRE I : INTRODUCTION 11

I. Les maladies infectieuses : historique et état des lieux 11

II. Les antibiotiques 12

- A) Origine et propriétés 12
- B) Classification générale 14
- C) Résistance aux antibiotiques 17

III. Les aminoglycosides 21

- A) Spectre d'activité 21
- B) Structure chimique et classification 22
- C) Mode d'action 24
 - 1) Assimilation intracellulaire 24
 - 2) Interaction avec leur cible principale : le site A de l'ARN 16S 24
 - 3) Autres cibles des aminoglycosides 28
- D) Effets secondaires 28
 - 1) Néphrotoxicité 28
 - 2) Ototoxicité 29

IV. La résistance aux aminoglycosides 30

- A) Les différents mécanismes de résistance aux aminoglycosides 30
 - 1) Réduction de la concentration intracellulaire 30
 - 2) Modification de la cible 31
 - 3) Formation de biofilm 32
 - 4) Modification de l'antibiotique par voie enzymatique 32
- B) Epidémiologie de la résistance 43
- C) Stratégies de contournement de la résistance aux aminoglycosides 44
 - 1) Nouveaux aminoglycosides 44
 - 2) Inhibiteurs d'enzymes de résistance 48

V. Les aminoglycosides *N*-6'-acétyltransférases 52

- 1) Etudes structurales 52
- 2) L'AAC(6')-Ib 56

VI. Objectifs et présentation des résultats 58

CHAPITRE II : RESULTATS 61

I. Etudes préliminaires 61

- A) Clonage, expression, mutagénèse 61
- B) Oligomérisation 62
- C) Spectre d'activité 62
- D) Production de l'enzyme marquée ¹⁵N 63

II. Conception d'inhibiteurs 65

- A) Le diaminocyclopentanol (DACP) comme mime de la désoxystreptamine 65
- B) Validation du mimétisme structural 67

| | |
|--|------------|
| 1) Sur le site A de l'ARN 16S d' <i>E. coli</i> | 67 |
| 2) Sur l'enzyme de résistance à large spectre : l'AAC(6')-Ib ₁₁ | 68 |
| 3) Conclusion..... | 70 |
| C) Conception des inhibiteurs : construction par fragment..... | 71 |
| D) Etude des inhibiteurs..... | 71 |
| 1) Criblage sur l'enzyme..... | 71 |
| 2) Mesure des constantes de dissociation par spectroscopie de fluorescence..... | 73 |
| 3) Empreintes RMN..... | 74 |
| 4) Tests d'inhibition..... | 76 |
| 5) Bilan..... | 76 |
| E) Inhibiteur « bi-substrat »..... | 78 |
| III. Recherche d'activité antibiotique..... | 80 |
| A) Le GB109, composé antibiotique..... | 80 |
| B) Identification du produit actif..... | 84 |
| C) Conclusion et perspectives..... | 85 |
| IV. Etudes structurales..... | 87 |
| A) L'AAC(6')-Ib ₁₁ | 87 |
| 1) Cristallogénèse..... | 87 |
| 2) Résolution de la structure..... | 88 |
| B) L'AAC(6')-Ib sauvage..... | 94 |
| 1) Cristallogénèse..... | 94 |
| 2) Résolution de la structure..... | 95 |
| C) L'AAC(6')-Ib-cr..... | 101 |
| 1) Cristallogénèse..... | 101 |
| 2) Modélisation de la structure..... | 101 |
| D) Comparaisons et analyses des structures..... | 103 |
| 1) Les différents mutants d'AAC(6')-Ib..... | 103 |
| 2) Comparaison avec les AAC(6') de structure connue (Iy et Ii)..... | 106 |
| 3) L'AAC(6')-Ib dans la super-famille des GNAT..... | 110 |
| CHAPITRE III : DISCUSSION..... | 115 |
| I. Origine de la résistance..... | 115 |
| II. Stratégie de contournement de la résistance..... | 116 |
| CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... | 119 |
| CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES..... | 123 |
| I. Production et purification des AAC(6')-Ib..... | 123 |
| II. Test d'activité <i>in vitro</i>..... | 124 |
| III. Mesure de CMI..... | 125 |
| IV. RMN..... | 126 |
| 1) Marquage isotopique à l'azote 15..... | 126 |
| 2) Spectre TROSY..... | 126 |
| 3) Saturation Transfer Difference (STD) et Reverse NOE pumping (RNP)..... | 126 |

| | |
|---|------------|
| V. Mesure de constantes de dissociation..... | 128 |
| VI. Antibiotogrammes | 129 |
| VII. Mesure de CI_{50}..... | 129 |
| VIII. Cristallographie aux rayons X..... | 130 |
| 1) Cristallogénèse | 130 |
| 2) Cryocristallographie | 131 |
| 3) Principe de la diffraction | 132 |
| 4) Traitement des données | 133 |
| 5) Détermination des structures | 136 |
| 6) Affinement | 139 |
| PUBLICATIONS | 141 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 157 |
| ANNEXES..... | 171 |

Abréviations

a. a : acide aminé

AAC : Aminoglycoside acétyltransférase

AMP : Adénosine monophosphate

ADP : Adénosine diphosphate

ANT : Aminoglycoside nucléotidyltransférase

APH : Aminoglycoside phosphotransférase

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

CI₅₀ : Concentration inhibitrice de 50% de l'activité

CMI : Concentration minimum inhibitrice

CoA : Coenzyme A

DACP : Diaminocyclopentanol

DIS : Dimerisation initiation site

DTNB : Acide-5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)

D.O : Densité optique

DOS : Désoxystreptamine

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

ERSF : European Synchrotron Radiation Facility

GNAT : GCN5-N-related acetyl transferase

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HSQC : Heteronuclear single quantum coherence

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

Kd : Constante de dissociation

NOE : Nuclear Overhauser effect

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RNP : Reverse noe pumping

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthilcilline

SARV : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine

SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis

Site A : Site de fixation de l'ARNt aminoacylé

STD : Saturation transfer difference

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

TROSY : Transverse Relaxation Optimized spectroscopy

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I. Les maladies infectieuses : historique et état des lieux

Les maladies infectieuses sont provoquées par des virus, des bactéries, des parasites ou des champignons. Ces microbes, qui constituent la plus ancienne forme de vie sur Terre, participent en grande majorité au bon fonctionnement de notre écosystème et sont pour la plupart non-pathogènes pour l'homme. Une faible proportion de ces microbes est responsable de maladies infectieuses aux conséquences dramatiques. Au cours des derniers siècles, de grandes épidémies ont ravagé le monde, comme la peste au Moyen-Age ou la grippe espagnole au début du XX^{ème} siècle. Aujourd'hui, avec la grippe, les hépatites, le SIDA, la tuberculose ou le paludisme, les maladies infectieuses sont responsables de plusieurs millions de décès chaque année, ce qui en fait l'une des premières causes de mortalité dans le monde (Davies 2007).

Plus de 90% de ces maladies surviennent dans les pays en voie de développement, où l'accès aux traitements est très limité. De plus, l'augmentation rapide de la population dans ces pays maintient une situation alarmante en matière de maladies infectieuses. En effet, elle implique une augmentation du réservoir potentiel de pathogènes et leur transmission est facilitée par la pauvreté, la promiscuité, l'hygiène insuffisante, la malnutrition et la carence en prévention. Les pays industrialisés ne sont pas pour autant à l'abri de la menace microbienne. Les maladies infectieuses, et particulièrement les infections nosocomiales (contractées à l'hôpital), sont de plus en plus fréquentes dans ces pays. Les progrès de la médecine permettent de prendre en charge à l'hôpital, des patients de plus en plus fragiles : patients immunodéprimés (maladie ou traitement en vue d'une greffe), personnes âgées, grands brûlés, grands prématurés, polytraumatisés. Ces patients présentent une sensibilité plus importante face aux infections bactériennes. Les actes invasifs (sonde, cathéter) et la chirurgie lourde augmentent également le risque de contracter une infection.

Les antibiotiques ou la vaccination permettent de lutter efficacement contre ces maladies infectieuses. Mais les bactéries ont la capacité de développer des résistances à ces traitements antimicrobiens. Entre l'homme et les microbes s'est engagée une course contre la montre. La recherche de nouvelles armes anti-infectieuses est plus que jamais nécessaire.

II. Les antibiotiques

A) Origine et propriétés

Les antibiotiques, dans la mesure où ils ont fait reculer le taux de mortalité en permettant de guérir certaines maladies infectieuses, sont sans doute les médicaments dont la découverte a le plus bouleversé la médecine et la démographie. Le terme « antibiotique » fut proposé en 1941 par Selman Waksman pour désigner « toute substance chimique produite par un micro-organisme capable d'inhiber le développement ou de détruire d'autres micro-organismes en solution diluée » (Denis *et al.* 2001). Les antibiotiques inhibant la croissance des bactéries sont dits bactériostatiques, ceux qui tuent les bactéries sont dits bactéricides.

L'histoire de la chimiothérapie antibactérienne démarre à l'aube du XX^{ème} siècle. Paul Ehrlich en donne le principe de base : une substance chimiothérapeutique utilisable par voie générale dans le traitement des maladies infectieuses doit être nuisible pour le micro-organisme pathogène, mais inoffensive pour les cellules de l'organisme hôte. Les recherches de Ehrlich aboutiront à soigner la syphilis avec le « salvarsan », composé contenant de l'arsenic qui tue les spirochètes. Le prix Nobel de médecine lui fut attribué en 1908. L'action bactériostatique de certains micro-organismes envers d'autres avait également été observée en 1877 par Louis Pasteur et J.-F Joubert à propos du bacille charbonneux. Pendant les années 30, Sir Alexander Fleming constata que la culture de staphylocoques était inhibée par la présence de moisissures du genre *Penicillium*. Fleming proposa que le champignon sécrétait une substance chimique bactériostatique (qui inhibe la croissance des bactéries), utilisable en thérapeutique humaine. Durant la même période, Gerhard Domagk en Allemagne, découvrit l'action antibiotique des composés sulfamidés, composés d'origine synthétique et non bactérienne. Pendant la seconde guerre mondiale, Ernst Boris Chain et Sir Howard Walter Florey poursuivirent les travaux de Fleming et isolèrent la « pénicilline » puis déterminèrent sa formule chimique. Les premiers médicaments à base de pénicilline furent fabriqués industriellement aux Etats-Unis en 1942 et permirent depuis de sauver plusieurs millions de vies humaines. Au cours des décennies suivantes, l'arsenal antibactérien n'a cessé de s'enrichir. En particulier, les bactéries du genre *Streptomyces* ont permis d'isoler de nombreux antibiotiques comme la streptomycine (1943), le chloramphénicol (1947) ou l'érythromycine (1952). Ces bactéries produisent environ deux tiers de tous les antibiotiques connus. L'abondance et la diversité structurale des antibiotiques synthétisés par ces bactéries ne se retrouvent dans aucun autre genre bactérien. Quelques 10 000 antibiotiques d'origine naturelle sont connus à ce jour, dont environ 80 % proviennent de bactéries et 20 % de moisissures. Tous ne sont pas employés,

les effets toxiques de certains d'entre eux empêchant leur utilisation en médecine humaine et vétérinaire (Walsh 2003).

Dans les années 1950-60 sont apparus de nouveaux antibiotiques synthétiques ou semi-synthétiques comme les quinolones et les fluoroquinolones. Depuis, d'autres classes d'antibiotiques correspondant à des améliorations de molécules déjà existantes sont apparues comme les céphalosporines (dérivés des β -lactamines), les kétolides (dérivés de macrolides) ou les glycylicyclines (dérivés des tétracyclines). De nouveaux antibiotiques agissant selon des nouveaux mécanismes d'action sont également apparus comme les oxazolidinones, obtenus par synthèse chimique (Slee *et al.* 1987) ou encore les antibiotiques peptidiques comme les lipopeptides, avec la daptomycine, qui présente une activité sur les souches résistantes aux autres antibiotiques (Stahl 2006) (Figure 1).

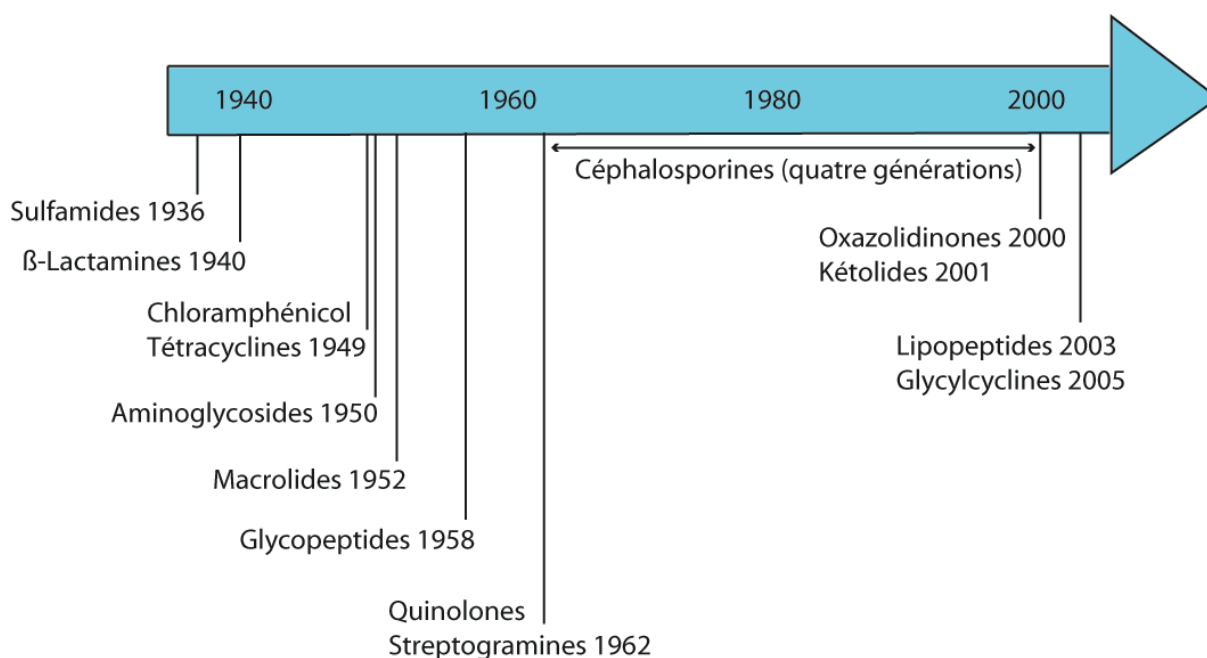


Figure 1 : Ordre chronologique de l'apparition des différentes classes d'antibiotiques en usage clinique. Adaptée de Walsh 2003.

B) Classification générale

La classification des antibiotiques est tout d'abord basée sur leur mécanisme d'action puis sur leur origine, leur nature chimique, leur modalité d'action et enfin leur spectre d'action. Les principaux mécanismes d'action des antibiotiques sont les suivants :

- inhibition de la synthèse des protéines, c'est le cas des aminoglycosides et d'environ la moitié des antibiotiques.
- inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne
- inhibition de la synthèse de la membrane plasmique
- inhibition du métabolisme des acides nucléiques
- inhibition du métabolisme intermédiaire
- poisons de la force proton-motrice et perméabilisants membranaires

Les tableaux 1 et 2 résument les différentes classes et propriétés des antibiotiques (Walsh 2003). Le cas des aminoglycosides, auxquels nous nous sommes intéressés, sera détaillé dans le paragraphe III de ce chapitre.

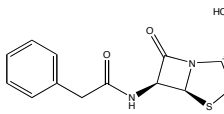
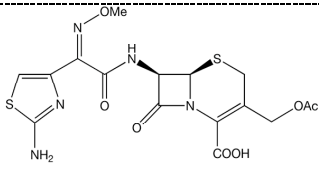
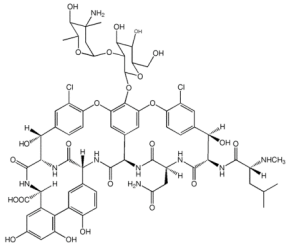
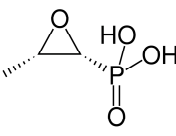
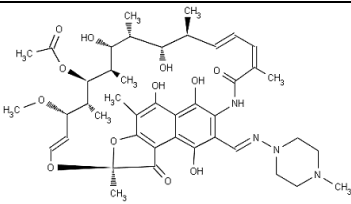
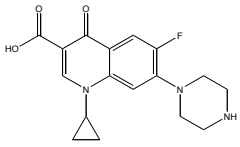
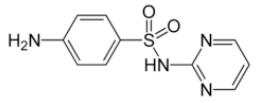
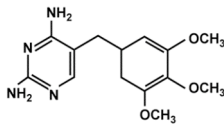
| Cible | Classe | Exemples | Origine | Structure chimique | Mode d'action | Spectre d'action |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------|---|--|--|------------------|
| Paroi cellulaire | β -lactamine | Penicilline | <i>Penicillium chrysogenum</i> |  | Inhibition des transpeptidases | Gram + |
| | Céphalosporines | Céfotaxime | Synthèse chimique |  | | Gram + Gram - |
| | Glycopeptide | Vancomycine | <i>Streptomyces orientalis</i> |  | Blocage de la synthèse du peptidoglycane | Gram + |
| | Fosfomycine | Fosfomycine | <i>Streptomyces</i> |  | Bloque la formation d'acide N-acétyl muraminique | Gram + Gram - |
| Membrane plasmique | Polymyxine | PolymyxineB Colistine | <i>Bacillus polymyxa</i> | Polypeptides de 10 acides aminés | Interaction avec les phospholipides membranaires | Gram - |
| | Lipopeptides | Daptomycine | <i>Streptomyces roseosporus</i> | Peptide cyclique polyanionique | Formation de canaux ioniques | Gram + |
| Synthèse des acides nucléiques | Rifamycine | Rifampicine | <i>Streptomyces nocardia mediterranei</i> |  | Blocage de la transcription par inhibition de l'ARN polymérase | Gram + Gram - |
| | Quinolones | Ciprofloxacine | Synthèse chimique |  | Blocage de la réplication de l'ADN par inhibition de la gyrase | Gram + |
| Métabolisme de l'acide folique | Sulfamides | Sulfadiazine | Synthèse chimique |  | Inhibition de la dihydrofolate synthétase | Gram + Gram - |
| | Diamino-pyrimidine | Triméthoprim | Synthèse chimique |  | Inhibition de la dihydrofolate réductase | Gram + Gram - |

Tableau 1 : Les différentes classes d'antibiotiques n'interférant pas avec la synthèse des protéines

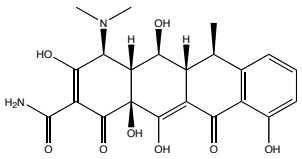
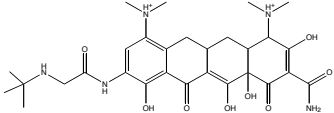
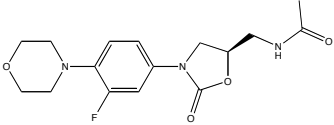
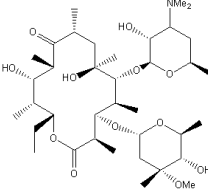
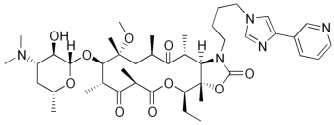
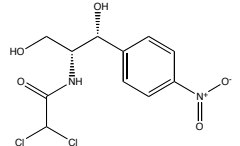
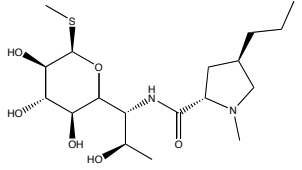
| Classe | Exemple | Origine | Structure chimique | Mode d'action | Spectre d'action |
|----------------|-----------------|----------------------------------|--|--|------------------|
| Tétracyclines | Doxycycline | <i>Streptomyces aureofaciens</i> |  | Inhibition de la fixation de l'ARN de transfert aminoacylé à la sous-unité 30S | Gram + Gram - |
| Glycylcyclines | Tigécycline | Synthèse chimique |  | Blocage de la sous-unité 30S par fixation au site de liaison de l'ARNt | Gram + Gram - |
| Oxazolidinones | Linezolid | Synthèse chimique |  | Inhibition de l'association des sous-unités 30S et 50S | Gram + |
| Macrolides | Erythromycine | <i>Streptomyces erythreus</i> |  | Inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique par fixation au site P de la sous-unité 50S | Gram + |
| Kétolides | Télithromycine | Synthèse chimique |  | Fixation sur un site supplémentaire de la sous-unité 50S par rapport aux macrolides | |
| Phénicolés | Chloramphénicol | <i>Streptomyces venezuelae</i> |  | Inhibition de l'activité peptidyl-transférase par liaison à la sous-unité 50S | Gram + Gram - |
| Lincosamides | Lyncomycine | <i>Streptomyces lincolnensis</i> |  | Inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique par fixation au site P de la sous-unité 50S (antagonisme avec les macrolides) | Gram + |

Tableau 2 : Les différentes classes d'antibiotiques interférant avec la synthèse des protéines
(suite page suivante)

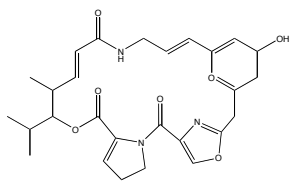
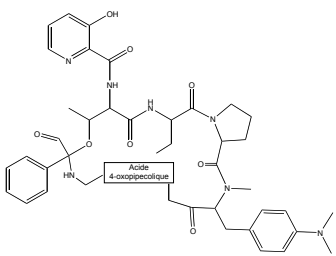
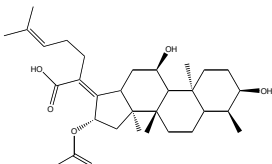
| Classe | Exemple | Origine | Structure chimique | Mode d'action | Spectre d'action |
|-----------------|------------------|------------------------------------|---|---|------------------|
| Synergistine | Streptogramine A | <i>Streptomyces graminofaciens</i> |  | Action synergique au niveau de la sous-unité 50S : inhibition de la fixation de l'ARN de transfert au ribosome et inhibition de la traduction de l'ARN messager | Gram + Gram - |
| | Streptogramine B | |  | | |
| Acide fusidique | Acide fusidique | <i>Fusidium coccineum</i> |  | Fixation au facteur EF-G d'élongation de la traduction empêchant la fixation de l'ARNt aminoacylé | Gram + |

Tableau 2 (suite) : Les différentes classes d'antibiotiques interférant avec la synthèse des protéines

C) Résistance aux antibiotiques

Après avoir révolutionné le traitement des maladies infectieuses, l'efficacité des antibiotiques est désormais remise en cause par les phénomènes de résistance bactérienne. L'émergence rapide de ces phénomènes de résistance est tout d'abord due aux processus d'adaptation qui président à l'évolution des espèces : dans un environnement sélectif et plutôt hostile, seuls les individus les mieux armés génétiquement survivent et se multiplient. Le grand nombre de cellules bactériennes dans une population (jusqu'à plusieurs millions par millilitre), leur court temps de génération, associés à la grande plasticité de leur génome facilitent l'apparition de mutants. Si une ou plusieurs mutations confèrent un avantage pour la survie, la bactérie résistante sera sélectionnée et pourra se multiplier.

Mais la surconsommation des antibiotiques ainsi que les prescriptions inappropriées sont responsables de l'augmentation de ces phénomènes de résistance (Neu 1992). La France est un des pays qui consomme le plus d'antibiotiques en Europe et dans le monde, même si

la prévention a permis, ces dernières années, de limiter l'augmentation de cette consommation. On compte en France environ 80 millions de prescriptions d'antibiotiques en ville par an et on estime que 50% de ces prescriptions sont inappropriées car prescrites dans le cadre d'infections virales (Choutet 2003). D'autre part, l'utilisation massive d'antibiotiques comme facteur de croissance dans l'alimentation animale a également favorisé l'apparition des résistances (Lipsitch *et al.* 2002 ; Smith *et al.* 2002). De plus, le coût global (environ 1 milliard de dollars) et le temps nécessaire à la recherche et au développement d'un nouvel antibiotique, peut pousser l'industrie pharmaceutique à se désinvestir peu à peu de cette recherche de nouveaux composés antibiotiques (Nathan et Goldberg 2005).

Les taux de résistance aux antibiotiques en France sont parmi les plus élevés d'Europe ; 36% des pneumocoques sont résistants à la pénicilline et 41% aux macrolides (Rapport 2005 de l'EARSS, *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* disponible sur www.earss.rivm.nl). De plus en plus de bactéries multirésistantes (BMR) émergent. Par exemple, la résistance des staphylocoques dorés devient particulièrement inquiétante. Cette bactérie responsable de nombreuses infections sévères (principalement des infections cutanées et des muqueuses pouvant aller jusqu'à la septicémie) s'est adaptée successivement aux différents antibiotiques (Deurenberg *et al.* 2007). La pénicilline était utilisée au départ pour traiter ces infections mais dès les années 50 des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline sont apparues (90% des souches sécrétaient des β -lactamases). La méthicilline est alors devenue le traitement de référence pour ces infections jusqu'à ce qu'apparaissent dans les années 80 des résistances à cet antibiotique (*S. aureus* résistant à la méthicilline : SARM). L'utilisation de la vancomycine s'est alors répandue ce qui a également conduit à l'apparition de souches résistantes à cet antibiotique (*S. aureus* résistant à la vancomycine : SARV) (Paterson 1999). De plus, les souches de SARM ne sont dorénavant plus limitées au secteur hospitalier mais des clones ont été décrits comme responsables d'infections communautaires (Grundmann *et al.* 2006).

Cette résistance a un impact non négligeable, mesuré par une plus grande probabilité de rechute des infections, une augmentation de la durée de séjour et des coûts d'hospitalisation, et une létalité plus importante (mortalité attribuable entre 17 et 30% selon les études) (French 2005 ; Stein 2005). Certaines bactéries sont maintenant résistantes à tous les antibiotiques, la médecine fait alors face à des échecs thérapeutiques, nous rapprochant de la situation de l'ère pré-antibiotique.

De plus, les médicaments de deuxième, voire de troisième intention, sont presque toujours beaucoup plus chers. Par exemple, les médicaments nécessaires au traitement des tuberculoses à bacilles multirésistants sont presque 100 fois plus chers que les médicaments de première intention pour les souches sensibles. Les dépenses impliquées peuvent alors être prohibitives (French 2005).

Selon l'OMS, les tendances actuelles donnent à penser que, d'ici dix ans, nous n'aurons plus de traitements efficaces pour certaines maladies. Il apparaît alors urgent de développer de nouvelles classes d'antibiotiques ainsi que des traitements ciblant les mécanismes de résistance des bactéries. Les actions de prévention et de contrôle de l'utilisation des antibiotiques doivent bien-sûr être poursuivies en parallèle.

D'autre part, des alternatives à l'antibiothérapie existent ou se développent :

- *Vaccination*

Les recherches sur le système immunitaire peuvent apporter des solutions antibactériennes. Une des fonctions de la réponse immune est de tuer les bactéries. La modulation de la réponse immune de l'hôte - par l'administration de vaccin (à titre thérapeutique ou préventif) - pour accroître l'immunité innée est un moyen de combattre les infections bactériennes. La vaccination existe déjà pour lutter contre certaines infections communautaires (exemple du DT-Polio contre la dyphtérie, le tétanos, et la poliomyélite) mais la recherche de vaccins contre les infections nosocomiales, comme le staphylocoque doré par exemple, se développe (Deresinski 2006).

- *Phagothérapie*

La phagothérapie, qui consiste à utiliser un virus bactérien (bactériophage ou phage) pour tuer une bactérie, est également considérée comme une alternative thérapeutique prometteuse. Cette technique ancienne a été dans une large mesure abandonnée dans le monde occidental après la découverte des antibiotiques. Toutefois, la recherche sur les phages s'est poursuivie tant en Pologne qu'en Russie, où les infections résistantes aux antibiotiques ont, semble-t-il, continué d'être traitées avec succès au moyen de phages vivants ou de produits de phages (Hanlon 2007).

- *Peptides antimicrobiens*

Les peptides antimicrobiens sont également une alternative à l'antibiothérapie classique. Ces peptides sont sécrétés dans le sang lors d'une infection bactériennes chez les invertébrés et constituent leur principal système de défense. Ils existent aussi chez l'homme où il viennent suppléer le système immunitaire. Ces peptides tuent les microorganismes en perméabilisant leur membrane par un effet de type détergent qui peut être accompagné de la formation de pores. Ce mécanisme d'action, original par rapport aux antibiotiques classiques, est très rapide, concentration dépendant et indépendant de l'interaction avec une cible moléculaire unique, ce qui devrait limiter l'apparition de phénomènes de résistance (Radek et Gallo 2007).

- *Stratégie antivirulence ou antipathogénicité*

Cette nouvelle approche consiste à cibler des facteurs de virulence de la bactérie (c'est à dire les facteurs qui confère à la bactérie sa capacité à infecter et à provoquer une maladie) sans interférer avec le métabolisme de base de la bactérie. Ces agents antibactériens stopperait la croissance des bactéries pathogènes mais n'affecteraient pas la croissance des bactéries dans leurs sites naturels (par exemple la paroi intestinale ou la peau). Ceci permettrait d'éviter l'apparition de mutants résistants à ces traitements. Ils pourraient donc être utilisés en prophylaxie pour des patients présentant un fort risque de contamination comme les patients immunodéprimés par exemple (Escaich 2006).

- *Sciences physiques*

Enfin, les recherches en sciences physiques et sur les biomatériaux proposent de nouvelles solutions. Des études sont menées sur la modification de l'environnement physique, comme la création de conditions hyperbares et le contrôle des températures. Les technologies comme les lasers et la lumière UV peuvent également être utilisé pour réduire le risque d'infection chez les patients qui subissent des traitements ou des interventions chirurgicales. Des biomatériaux peuvent également être conçus pour réduire ou éliminer la croissance bactérienne et la formation de biofilms. Des exemples seraient l'introduction de surfaces « super lisses » sur les articulations artificielles ou encore la création de biomatériaux imprégnés d'agents anti-infectieux (Davies 2007).

Toutefois, l'antibiothérapie reste incontournable dans notre arsenal thérapeutique à condition de développer rapidement des stratégies pour contrer la résistance aux antibiotiques.

III. Les aminoglycosides

A) Spectre d'activité

La famille des aminoglycosides ou aminosides occupe une place particulière dans l'arsenal des antibiotiques. Depuis la découverte de la streptomycine en 1944, utilisée pour traiter la tuberculose, une quinzaine de molécules seulement ont été développées en thérapeutique humaine. Cependant malgré leur « ancienneté », les aminoglycosides conservent une activité bactéricide remarquable vis-à-vis notamment des bacilles à Gram négatif aérobies. Leur bactéricidie rapide sur de nombreux agents pathogènes les rendent incontournables, malgré leur faible diffusion tissulaire, pour le traitement de beaucoup d'infections sévères (infections nosocomiales, comme les pneumopathies, les pyélonéphrites et les endocardites). Les aminoglycosides sont des antibiotiques dont le spectre théorique est très large incluant tous les germes à Gram négatif aérobies (bacilles, cocci et coccobacilles à Gram négatif) ainsi que les staphylocoques et les bacilles à Gram positif. En revanche, les streptocoques, y compris les entérocoques et les pneumocoques, et les germes anaérobies sont naturellement résistants à ces antibiotiques administrés seuls. Cette résistance est liée à une imperméabilité de la bactérie à l'antibiotique qui ne peut plus atteindre sa cible intracellulaire (Veber *et al.* 1999).

Tous les aminoglycosides ne présentent pas la même activité envers les bactéries traitées. Par exemple, la gentamicine est plus active que la tobramycine sur des souches de *Serratia* spp., alors que la tobramycine est plus efficace que la gentamicine contre *Pseudomonas aeruginosa*. L'arbekacine, largement utilisée au Japon, a le spectre d'activité le plus large. Cet antibiotique est particulièrement actif sur les souches de SARM, y compris celles résistant aux autres aminoglycosides. (Vakulenko et Mobashery 2003).

Les aminoglycosides sont synergiques avec les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi cellulaire comme les β -lactamines et la vancomycine. Ce synergisme est probablement dû à l'augmentation de la pénétration intracellulaire des aminosides grâce à la perméabilité accrue des bactéries induite par les β -lactamines ou la vancomycine. Même si cet effet synergique est clairement établi pour beaucoup de microorganismes, un effet antagoniste a été découvert récemment entre les aminosides et les β -lactamines (Ida *et al.* 2002). Cet antagonisme est dû à l'induction par les β -lactamines de la production d'une enzyme de résistance aux aminoglycosides, l'AAC(6')-APH(2''). Il est particulièrement inquiétant car découvert dans des souches de SARM.

B) Structure chimique et classification

Les aminoglycosides sont des molécules hydrophiles et polycationiques. Ils sont basiques, leur activité est donc optimale à pH alcalin et inhibée en milieu acide. Leur structure se décompose en un cycle central aminocyclitol relié à des sucres aminés par des ponts glycosidiques. Ce cycle central peut être la streptidine, l'actinamine ou la fortamine mais le plus souvent il s'agit de la 2-désoxystreptamine (DOS) (figure 2). Les composés contenant le cycle DOS sont séparés en sous-familles classées en fonction de la substitution de ce cycle. Celui-ci peut être monosubstitué en position 4 (néamine) ou 5 (hygromycine B) ou bisubstitué en position 4 et 5 (groupe 4,5-2-DOS) ou 4 et 6 (groupe 4,6-2-DOS). Le cycle I lié en position 4 du cycle DOS (cycle II) est numéroté par des chiffres prime, le cycle III lié en position 5 ou 6 est lui numéroté par des chiffres double prime. Un quatrième cycle (cycle IV) existe dans certains aminosides, il est relié au cycle III et numéroté par des triples prime (Vakulenko et Mobashery 2003). Les cycles I et II constituent la partie néamine, qui est elle-même un antibiotique mais d'activité moindre (figure 3). Les aminosides actuellement commercialisés appartiennent essentiellement au groupe des 4,6-2-DOS qui se divise en deux sous-groupes : celui de la kanamycine, produit par des souches de type *Streptomyces* et le groupe de la gentamicine, produit par des souches de type *Micromonospora* (noté la différence d'orthographe de l'antibiotique en fonction de la souche) (Veber *et al.* 1999). Les aminoglycosides les plus récents sont semi-synthétiques, comme l'amikacine ou la nétilmicine qui possèdent une substitution en position 3 du cycle DOS (figure 3).

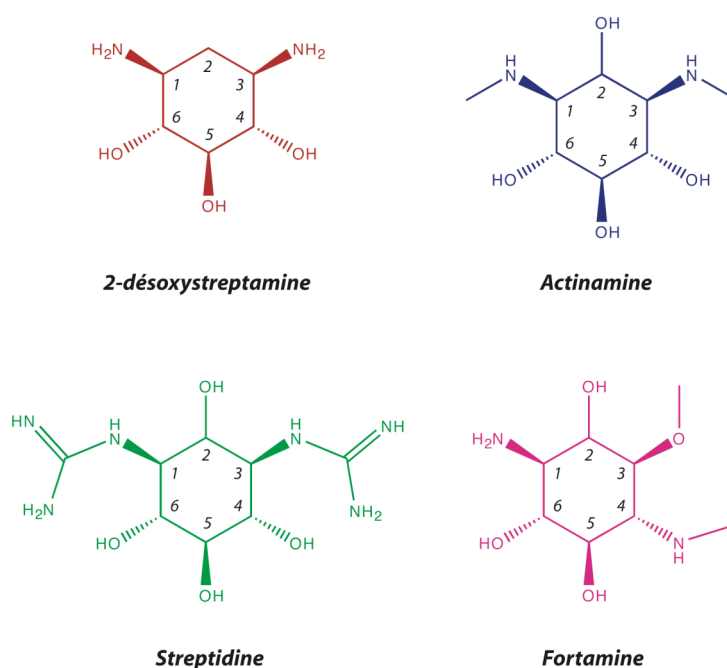


Figure 2: Les différents diaminocyclitols, cycles centraux des aminoglycosides

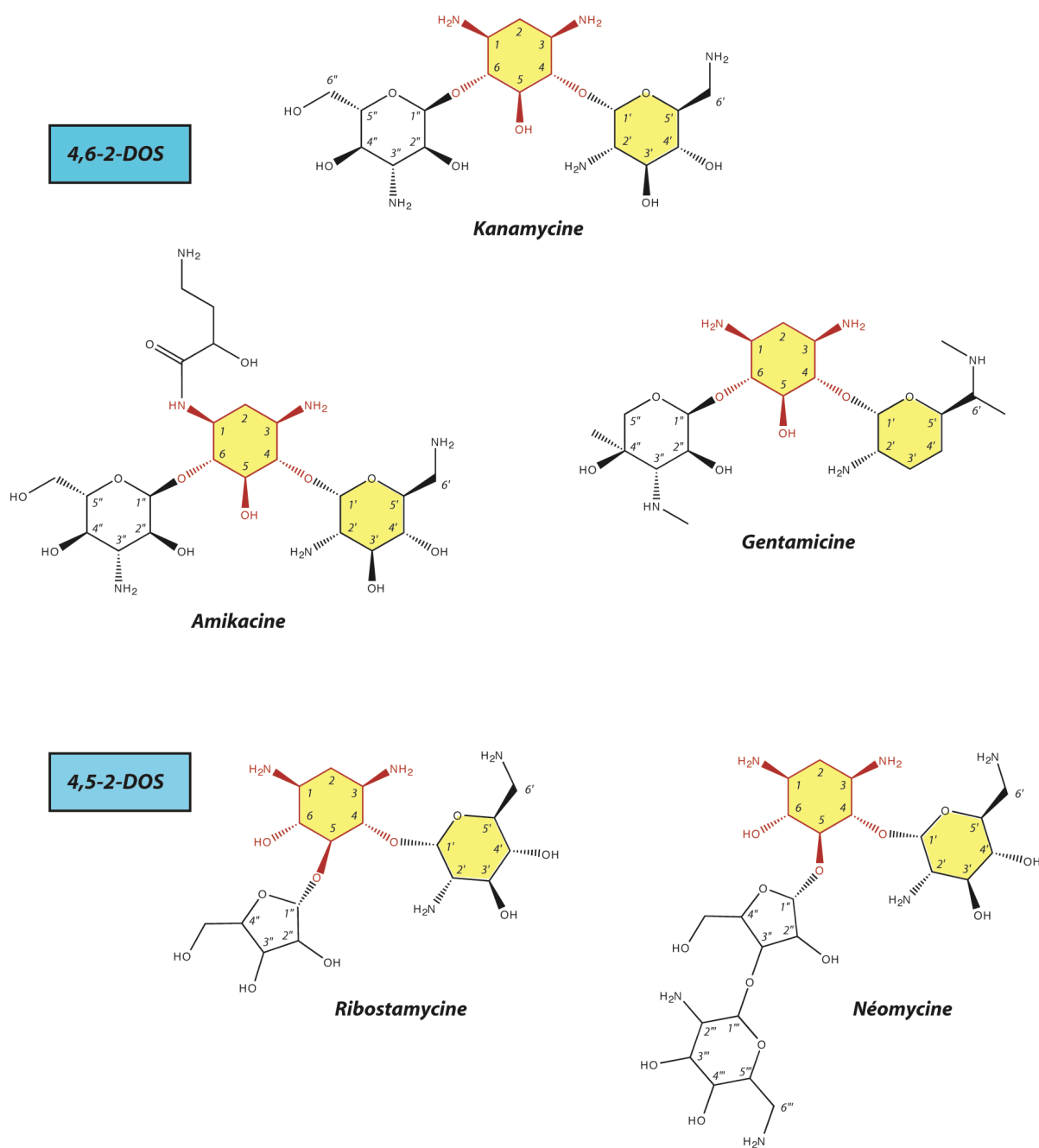


Figure 3 : Exemples d'aminoglycosides contenant le cycle DOS (tracé en rouge) substitué en position 4 et 5 ou 4 et 6 utilisés en clinique. La partie néamine commune est colorée en jaune.

C) Mode d'action

1) Assimilation intracellulaire

Le mécanisme d'action des aminosides repose sur leur pénétration dans le cytoplasme des bactéries où se localise leur cible, le ribosome. L'entrée des aminoglycosides dans la cellule s'effectue en trois étapes (Taber *et al.* 1987). La première étape, énergie-indépendante, repose sur les interactions électrostatiques entre les aminosides (chargés positivement) et les phospholipides ou les lipopolysaccharides (chargés négativement) de la membrane des bactéries. Cette fixation induirait une rupture des ponts salins (Mg^{2+} et Ca^{2+}) qui relient les lipopolysaccharides entre eux. La perméabilité de la membrane externe des bactéries est alors augmentée (Hancock 1984). Lors de l'étape suivante appelée phase I, les aminosides traversent la membrane plasmique par un mécanisme dépendant de l'énergie fournie par le potentiel transmembranaire. Ceci explique l'inactivité des aminosides sur les microorganismes ne possédant pas de système de transport d'électrons comme les bactéries anaérobies (Taber *et al.* 1987). Durant cette phase, seule une petite quantité d'antibiotiques traverse la membrane plasmique. Au sein de la bactérie, leur fixation sur le ribosome induit des erreurs de lecture de l'ARNm à traduire et conduit à la production de protéines aberrantes. Certaines de ces protéines sont incorporées dans la membrane plasmique et vont l'endommager en formant des pores. Les événements se suivent alors en cascade dans une phase appelée phase énergie-dépendante II. La membrane étant endommagée, une plus grande quantité d'antibiotiques pénètre dans la cellule, s'accumule dans le cytoplasme et sature les ribosomes. Leur activité est alors inhibée, la synthèse des protéines est bloquée ce qui conduit à la mort de la bactérie. L'activité des aminoglycosides est dose-dépendante, plus la concentration en antibiotique est importante plus la phase II est rapide et plus rapide est la mort de la bactérie (Vakulenko et Mobashery 2003).

2) Interaction avec leur cible principale : le site A de l'ARN 16S

Les aminoglycosides ont pour cible principale la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Ils se fixent sur l'ARN ribosomique (ARNr) 16S, sur le site accepteur des ARNt aminoacylés appelé site A (figure 5). Deux structures cristallographiques de la sous-unité 30S de *Thermus thermophilus* ont été résolues en 2000 (Schluenzen *et al.* 2000; Wimberly *et al.* 2000). Ces études ont apporté des informations précieuses sur le fonctionnement du processus de décodage. La fidélité de traduction reposerait sur deux étapes : une étape de reconnaissance initiale entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt suivie d'une étape de « relecture-correction » (proofreading) (Hopfield 1974). Le site A est formé par l'hélice 44, la boucle 530 et l'hélice 34 de l'ARN ribosomique. La sélection de l'ARNt aminoacylé durant

la traduction se traduit par la formation d'une minihélice entre le codon de l'ARNm et la boucle anticodon de l'ARNt complémentaire. Quand un complexe ARNm-ARNt est formé, les bases A1492 et A1493 de l'hélice 44 modifient leur orientation et interagissent directement avec le petit sillon de l'hélice codon-anticodon. L'extrusion de ces deux adénines augmente donc l'affinité du ribosome pour le complexe ARNm-ARNt complémentaire et stabilise le complexe ribosome/ARNt/ARNm (Ogle *et al.* 2001).

Les premières études structurales de complexes avec des aminoglycosides ont été réalisées avec un ARN tige-boucle de 27 nucléotides mimant l'hélice 44 du site A. La structure du complexe entre cet ARN et la paromomycine (groupe 4,6-2-DOS) a été résolue par RMN (Fourmy *et al.* 1996). Cette structure révèle que le cycle I (prime) se fixe dans la région formée par la paire A1408-A1493 et par l'adénine non appariée 1492. La majorité des contacts intermoléculaires impliquent le cycle DOS et le cycle prime. Les changements les plus importants induits par la fixation de l'antibiotique se situent au niveau des adénines 1492 et 1493 qui se retournent vers le petit sillon (figure 4). Les complexes avec la néomycine et la ribostamycine ont également montré les mêmes contacts intermoléculaires que la paromomycine (Fourmy *et al.* 1996). En 2000, Carter *et al.* ont résolu les structures cristallographiques de la sous-unité 30S complexée avec différents aminoglycosides (Carter *et al.* 2000). La structure du complexe avec la paromomycine confirme que celle-ci se fixe bien sur le site A dans le grand sillon de l'hélice 44 et montre une extrusion plus importante des deux adénines 1492 et 1493. Les structures des complexes entre la tobramycine et la kanamycine (groupe 4,5-2-DOS) et un ARN synthétique mimant le site A ou un dimère de site A ont été résolues par cristallographie en 2002 et 2005 respectivement (Vicens *et al.* 2002; Francois *et al.* 2005). Ces structures révèlent que les interactions avec les aminoglycosides du groupe des 4,5-2-DOS sont similaires à celles observées avec les aminoglycosides du groupe des 4,6-2-DOS.

La fixation des aminoglycosides contenant la désoxystreptamine provoque donc un changement de conformation similaire à celui provoqué par la reconnaissance du complexe ARNm-ARNt complémentaire. Ceci confirme les résultats biochimiques montrant que la liaison de ces aminosides défavorise la dissociation entre le site A et les ARNt et augmente l'affinité du site A pour les ARNt (Pape *et al.* 2000). La fixation des aminoglycosides augmente donc l'affinité du site A pour des complexes ARNt-ARNm non complémentaires. Le ribosome ne peut plus discriminer les complexes complémentaires des complexes non complémentaires, les erreurs de traduction se produisent alors.

Les interactions des aminoglycosides avec le ribosome diffèrent selon la classe d'aminoside. Bien que le cycle central de la streptomycine soit la streptidine, son site de fixation sur le site A est très proche de celui des dérivés de la désoxystreptamine, mais elle interagit également avec la protéine S12. Elle provoque également des erreurs de lecture du

code génétique mais son mécanisme d'action est quelque peu différent. Pendant le processus de décodage, le ribosome peut adopter deux conformations différentes. La première, appelée ram pour "*ribosome ambiguity conformation*", lui confère une haute affinité pour les ARNt et diminue donc la fidélité de traduction. La deuxième conformation, plus stable, diminue l'affinité pour les ARNt. La fixation de la streptomycine stabiliserait la conformation ram, conduisant à des erreurs de traduction (Carter *et al.* 2000).

La spectinomycine se fixe elle sur l'extrémité de l'hélice 34, proche de l'hélice 28 et d'une boucle de la protéine S5. Elle inhibe la translocation de l'ARNt peptidyl du site A au site P (site de fixation de l'ARNt peptidyl). Elle ne provoque pas d'erreurs de traduction et son effet est bactériostatique.

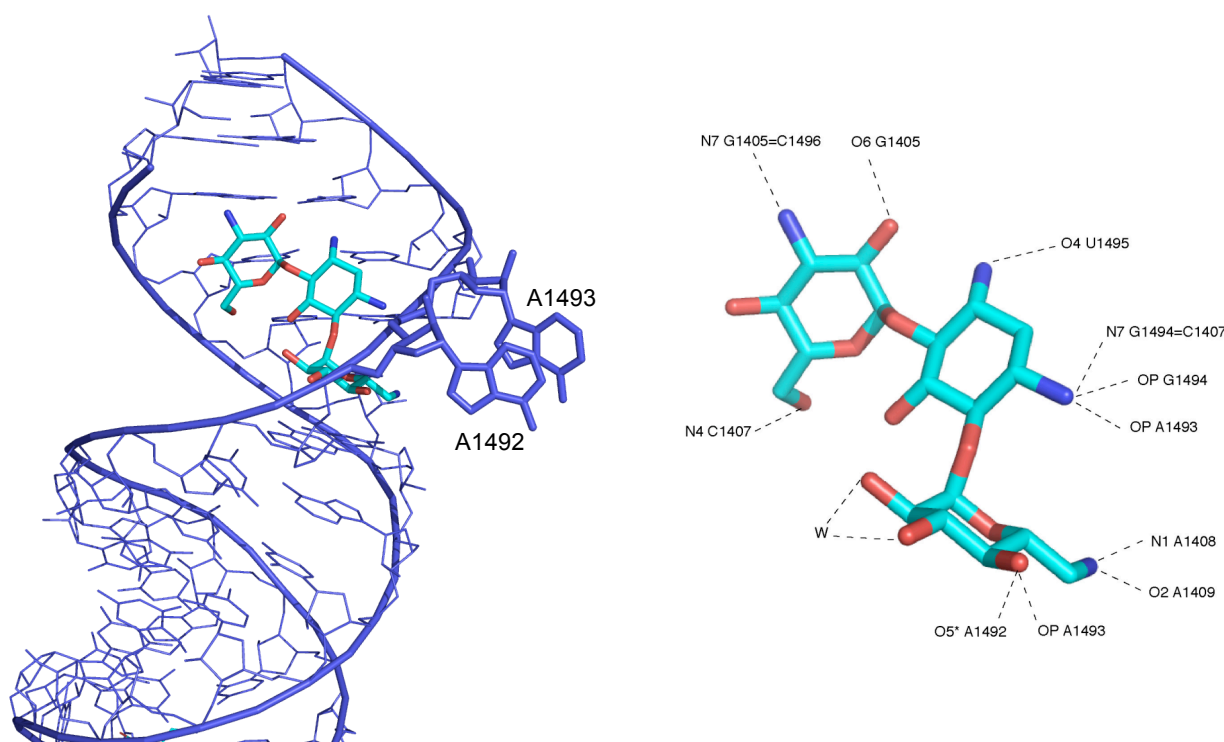


Figure 4 : A gauche : structure du site A complexé à la kanamycine (code PDB 2ESI) résolue par cristallographie aux rayons X (Francois *et al.* 2005). La fixation de la kanamycine provoque l'extrusion des deux adénines 1492 et 1493. A droite : interactions principales entre la kanamycine et les nucléotides du site A. Les atomes de la kanamycine sont colorés en rouge pour les oxygènes, en bleu pour les azotes et en cyan pour les carbones.

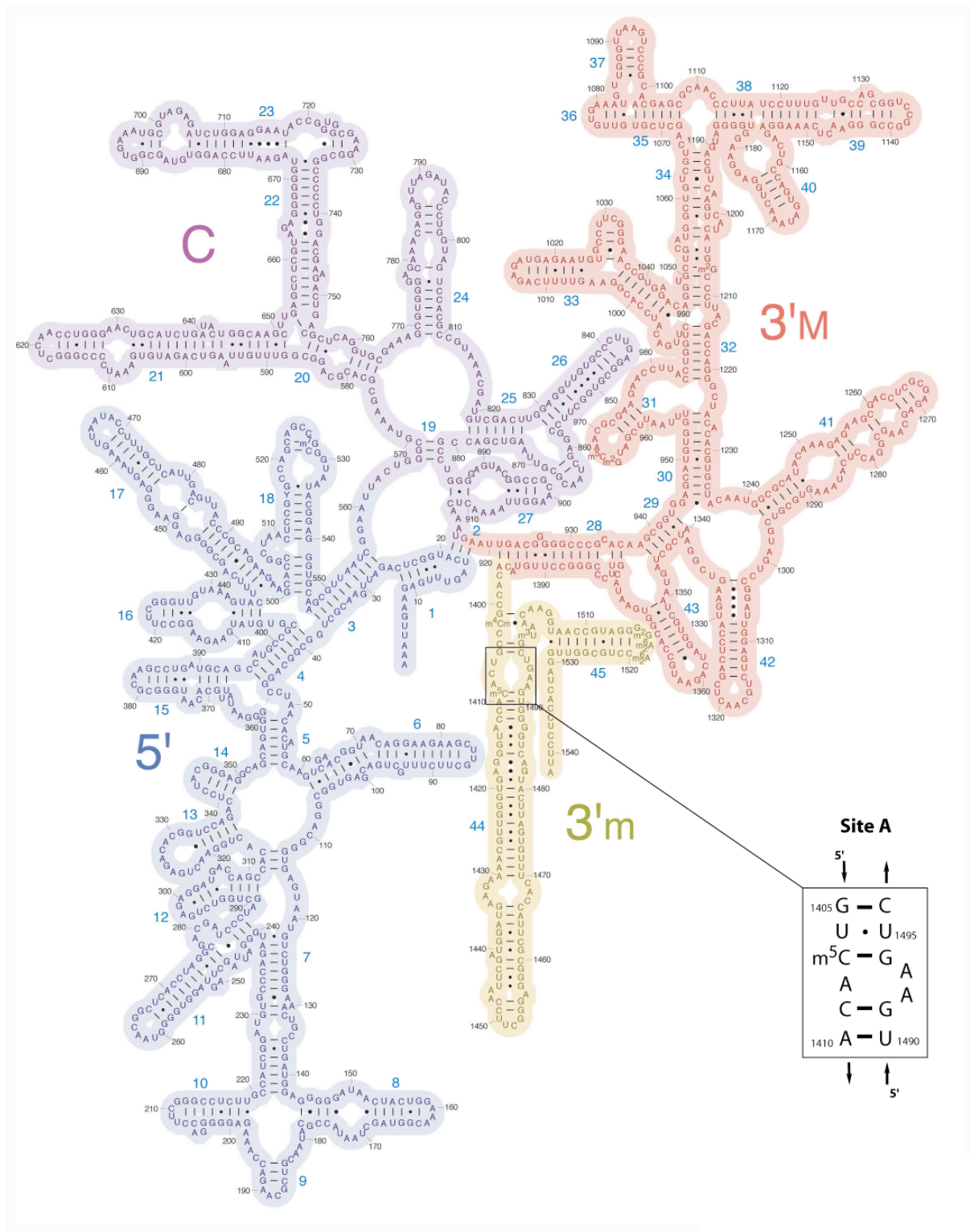


Figure 5 : Localisation du site A au sein de la structure secondaire de l'ARN 16S de *Escherichia coli*. Source : rna.ucsc.edu/rnacenter/ribosome_images.html.

3) Autres cibles des aminoglycosides

Les aminoglycosides sont également connus pour se fixer sur beaucoup d'autres ARN structurés comme par exemple le site de dimérisation (DIS pour Dimerisation Initiation Site) du VIH-1 (Ennifar *et al.* 2007), les motifs TAR (Transactivating responsive element) (Mei *et al.* 1998) et RRE (Rev responsive element) (Zapp *et al.* 1993) de l'ARN du VIH-1, l'IRES (Internal ribosome entry site) de HCV (Le *et al.* 1996). Les possibilités thérapeutiques des aminoglycosides et de leur dérivés sont donc importantes et dépassent le champ d'action de l'antibiothérapie.

D) Effets secondaires

D'importants phénomènes de toxicité liés à l'usage des aminoglycosides ont été identifiés au niveau du rein (nephrotoxicité) et de l'oreille interne (ototoxicité). Plus rarement, des phénomènes d'hypersensibilité et de blocage de l'activité neuromusculaire (effet curare-like) dus à une compétition avec les ions calcium ont été observés. Ces phénomènes de toxicité limitent l'utilisation des aminoglycosides, en particulier les doses ne peuvent être augmentées pour lutter contre les bactéries présentant des mécanismes de résistance.

1) Nephrotoxicité

Les aminoglycosides, éliminés par filtration glomérulaire, se lient à la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales. L'accumulation de ces antibiotiques dans les cellules tubulaires proximales du rein est responsable du développement d'une toxicité spécifique. Les lésions observées concernent essentiellement les cellules tubulaires proximales et peuvent aller jusqu'à la nécrose tubulaire. Néanmoins, la régénération cellulaire implique une évolution habituellement sans séquelles histologiques ou fonctionnelles. Des lésions glomérulaires et tubulaires distales sont possibles (Mingeot-Leclercq et Tulkens 1999). La liaison des aminoglycosides au site A des ribosomes cytoplasmiques (Lynch et Puglisi 2001) et des ribosomes des organelles (microsomes et mitochondries) (Ali 1995) a aussi été identifiée comme source de toxicité (figure 6).

Son incidence, difficile à estimer, était de 10 % dans les années 1980 et a nettement diminué, du fait d'une meilleure connaissance de la pharmacodynamique de ces antibiotiques et des facteurs de risque associés. Bien que les études soient discordantes, il est probable que la gentamicine soit le plus néphrotoxique des aminosides usuels et l'amikacine le moins (Veber *et al.* 1999).

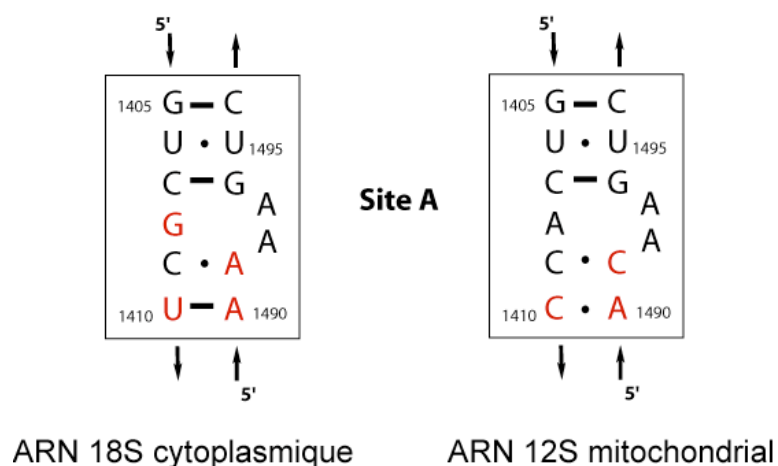


Figure 6 : Séquences des sites A cytoplasmiques et mitochondrial chez l'homme. Les nucléotides différents du site A de *E. coli* sont en rouge. La numérotation indiquée correspond à celle du site A d'*E. coli*.

2) Ototoxicité

L'accumulation des aminoglycosides dans les cellules ciliées de la cochlée est responsable du développement d'une toxicité spécifique. La plupart des lésions induites sont aspécifiques et sont le signe d'une dégénérescence (Begg et Barclay 1995). Les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus mais pourraient englober une inhibition de la cascade des phosphoinositides (et donc de la régulation du métabolisme cellulaire) consécutive à la liaison de l'aminoglycoside au lieu de Ca^{2+} au phosphatidylinositol biphosphate sur la face interne de la membrane plasmique (Forge et Schacht 2000).

La toxicité se manifeste au niveau vestibulaire par des nausées, des vertiges, du nystagmus ou parfois des céphalées. Elle se rencontre surtout avec la streptomycine. Au niveau cochléaire, le développement de la toxicité provoque des bourdonnements d'oreille et des pertes auditives commençant d'abord par les hautes fréquences et évoluant ensuite vers les fréquences conventionnelles, entraînant une surdité qui peut être complète (Bates 2003). Contrairement à la toxicité rénale, la toxicité auditive est irréversible (car elle touche un tissu nerveux) et cumulative si l'on administre plusieurs traitements au même patient.

Son incidence varie selon les molécules de 3 à 14 % pour l'atteinte cochléaire et de 1 à 14 % pour l'atteinte vestibulaire (Veber *et al.* 1999).

IV. La résistance aux aminoglycosides

A) Les différents mécanismes de résistance aux aminoglycosides

Trois principaux mécanismes de résistance aux aminoglycosides sont employés par les bactéries : la diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique, la modification de leur cible et l'inactivation de l'antibiotique par modification enzymatique. Plus récemment, il a été découvert que la formation de biofilms par les bactéries pouvait induire une résistance aux aminoglycosides. Le mécanisme le plus fréquemment rencontré et conférant une résistance de haut niveau est la résistance associée à une enzyme de modification de l'antibiotique.

1) Réduction de la concentration intracellulaire

La diminution de la pénétration des aminoglycosides et l'activation de mécanismes d'efflux sont les deux processus réduisant la concentration intracellulaire des aminoglycosides responsables de la résistance intrinsèque ou acquise de certaines souches à ces antibiotiques (Magnet et Blanchard 2005).

a) Diminution de la pénétration

La modification des éléments impliqués dans l'étape initiale de l'assimilation des aminoglycosides confère une résistance à ces antibiotiques particulièrement chez *Pseudomonas aeruginosa* (Bryan *et al.* 1984). Dans des souches cliniques de cette bactérie résistantes à la gentamicine, les lipopolysaccharides présentent une diminution de leur charge négative. Cette modification de la charge diminue les interactions électrostatiques et donc l'affinité entre la gentamicine et ces lipopolysaccharides (Kadurugamuwa *et al.* 1993). D'autre part, les alginates, produits par les souches de *Pseudomonas aeruginosa*, diminuent la pénétration intracellulaire des aminoglycosides. Ces alginates, connus pour inhiber la phagocytose, forment des gels polyanioniques qui agiraient comme une « trappe » physique et ionique empêchant la pénétration des aminoglycosides (Hatch et Schiller 1998).

b) Mécanisme d'efflux

Les mécanismes d'efflux sont une des causes majeures de résistance aux antibiotiques. Certaines souches bactériennes exprimant ces transporteurs sont intrinsèquement résistantes à de faibles concentrations d'antibiotiques. Cet efflux actif de l'antibiotique s'effectue par des protéines transmembranaires situées dans la membrane cytoplasmique ou dans la membrane externe des bactéries gram-négatives (Walsh 2003). Pendant

longtemps, ces mécanismes d'efflux se sont limités aux molécules hydrophobes ou amphiphiles, les aminoglycosides n'étaient donc pas touchés par ce mode de résistance. Cependant, il a été montré ces dernières années que les aminosides pouvaient être des substrats pour certaines pompes à efflux, y compris des pompes appartenant aux cinq superfamilles de transporteurs. Par exemple, les protéines MexY de *P.aeruginosa*, AmrB de *B. pseudomallei*, AcrD d'*E. coli* ou encore AdeABC de *A. baumannii* appartenant à la superfamille des RND (Resistance nodulation cell division) seraient impliquées dans la résistance intrinsèque de ces espèces aux aminoglycosides (Putman *et al.* 2000).

2) Modification de la cible

a) Méthylation de l'ARN16S

Pour résister à leur propre sécrétion d'antibiotiques, beaucoup d'organismes producteurs d'aminoglycosides expriment des enzymes capables de modifier l'ARN 16S sur des bases impliquées dans la fixation de l'aminoside (Cundliffe 1989). Certaines de ces enzymes, regroupées dans la famille des méthyltransférases Agr (pour Aminoglycoside resistance), ont été identifiées. Les enzymes KamA et KamB de *Streptomyces tenjimariensis* et *Streptomyces tenebrarius* catalysent la modification de la position N1 de l'adénine 1408 et confèrent un haut niveau de résistance à la kanamycine, la tobramycine, la sisomycine et l'apramycine mais pas à la gentamicine (Skeggs *et al.* 1985).

Ce mode de résistance confère également une résistance de haut niveau chez les entérobactéries. La présence d'un nouveau gène appelé armA (aminoside resistance methylase) sur un plasmide auto-transférable chez une souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* lui confère la résistance à de nombreux antibiotiques et aux aminoglycosides 4,6-2-DOS. La séquence déduite ArmA présente de 37 à 47% de similitude avec les méthylases de l'ARNr 16S des souches productrices d'aminosides. Ce gène armA est flanqué de séquences d'insertion et est lié au gène blaCTX-M3 qui confère la résistance aux céphalosporines par synthèse d'une β -lactamase à spectre élargi. Il est largement disséminé et a été retrouvé chez différentes espèces d'entérobactéries isolées dans plusieurs pays européens (Galimand *et al.* 2003).

b) Mutations du ribosome

La résistance aux aminoglycosides par mutation du ribosome n'a de signification clinique que pour la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* à la streptomycine. *M. tuberculosis* est la seule eubactérie qui ne contient qu'une seule copie de l'opéron codant pour les ARN ribosomiques. Une mutation unique peut alors conduire à la production d'une population de ribosomes mutants, ce qui peut induire une résistance malgré la nature récessive de la mutation impliquée (Magnet et Blanchard 2005). Ces mutations se situent au niveau du site de fixation de la streptomycine et impliquent une diminution de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible (Powers et Noller 1991).

3) Formation de biofilms

Les biofilms sont des agrégats de cellules bactériennes qui peuvent adhérer aux surfaces (sondes, cathéters) y compris les surfaces biologiques comme les tissus humains. Ces biofilms permettent à la bactérie de résister aux antibiotiques et contribuent à la persistance des bactéries lors d'une infection chronique (Mah *et al.* 2003). Les bactéries formant des biofilms sécrètent une matrice extra-cellulaire adhésive et protectrice empêchant la pénétration des antibiotiques. Il a été montré que les aminoglycosides, à faible concentration, pouvaient induire la formation de biofilms chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Le gène responsable de cette résistance par biofilm a été identifié chez *P. aeruginosa* et appelé *arr* pour « aminoglycoside response regulator ». Il coderait pour une phosphodiesterase de la membrane interne. Le substrat de cette enzyme est une di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) connue pour réguler l'adhésion des cellules sur une surface. L'enzyme fixe les c-di-GMP, leur quantité dans la cellule diminue et des biofilms peuvent alors se former (Hoffman *et al.* 2005).

4) Modification de l'antibiotique par voie enzymatique

Le mécanisme le plus fréquemment rencontré de résistance aux aminoglycosides est la modification de ceux-ci par voie enzymatique. Cette modification structurale consiste en l'ajout d'un groupement sur les positions aminées ou hydroxylées des aminoglycosides ce qui empêche leur fixation sur le site A. Ce groupement peut être un groupement nucléotidyl pour les aminoglycosides O-nucléotidyltransférases (ANT), un groupement phosphoryl pour les aminoglycosides O-phosphotransférases (APH) ou enfin un groupement acétyl pour les aminoglycosides N-acétyltransférases (AAC) (figure 7). Les différentes positions modifiées sont représentées sur la figure 8 et indiquées entre parenthèses dans la nomenclature des

enzymes. Chaque type d'enzymes est divisé en sous-classes (indiquées par un chiffre romain) représentant un phénotype de résistance particulier. Enfin, une lettre minuscule identifie chaque enzyme correspondant à un gène spécifique. L'enzyme que nous avons étudiée, l'AAC(6')-Ib, est donc une aminoglycoside *N*-acétyl transférase catalysant l'acétylation de la position 6', c'est une enzyme particulière "b" du groupe de phénotype "I".

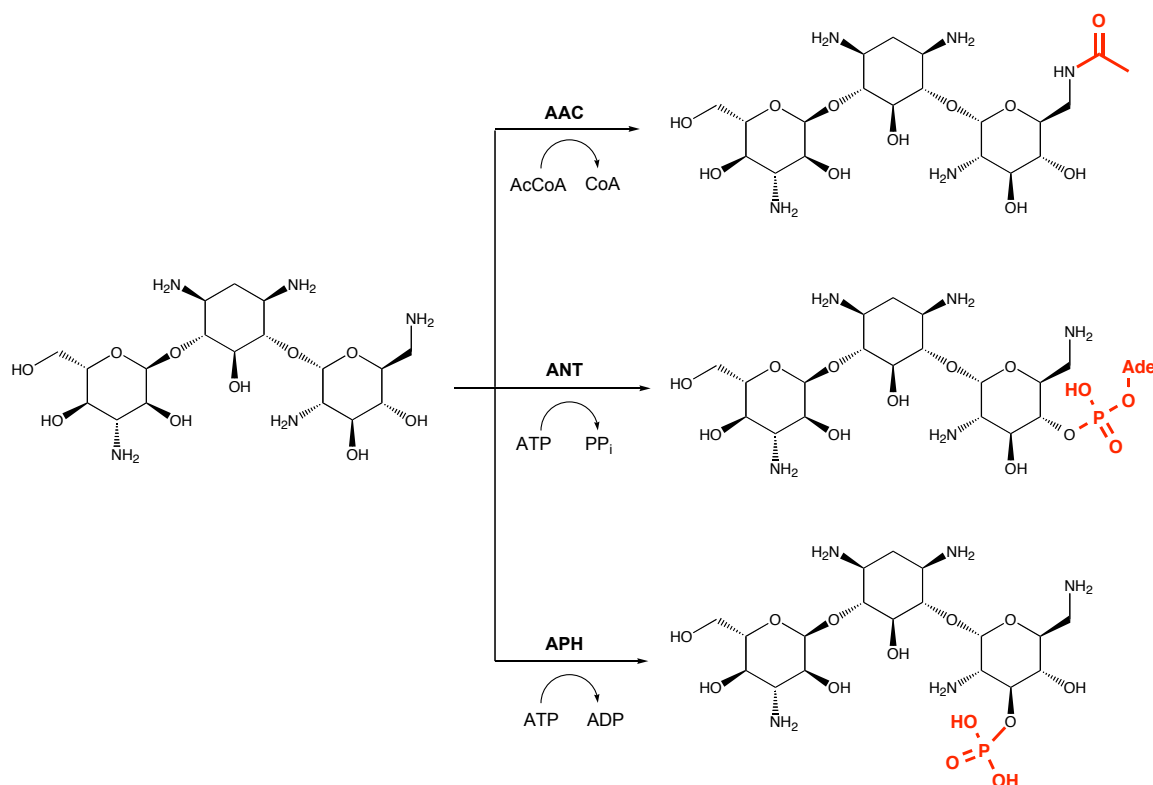


Figure 7 : Réactions d'acétylation, d'adénylation et de phosphorylation de la kanamycine catalysées par les AAC, les ANT et les APH respectivement

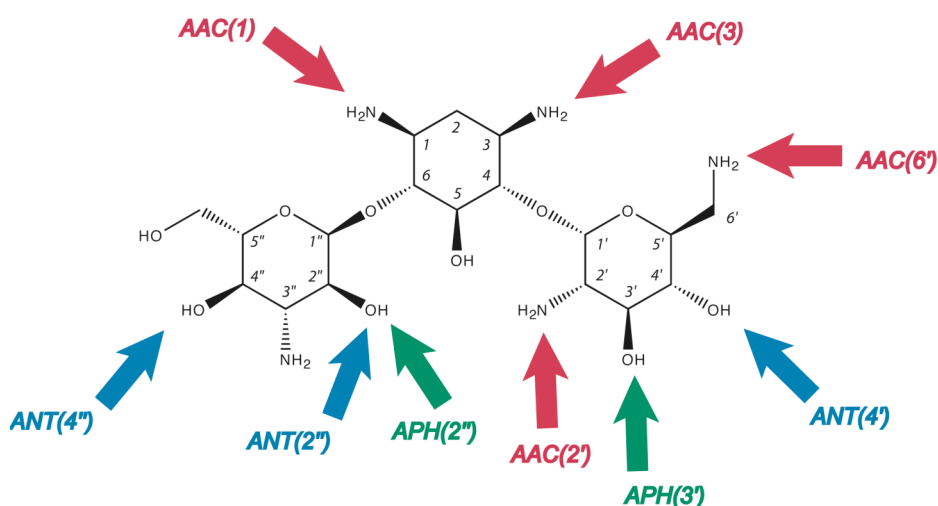


Figure 8 : Exemples de sites de modification des aminoglycosides par les enzymes AAC, APH et ANT pour la kanamycine.

a) Les nucléotidyltransférases (ANT)

Les nucléotidyltransférases représentent la plus petite classe d'enzymes de résistance aux aminoglycosides avec seulement une dizaine d'enzymes identifiées. Elles ont cependant un impact clinique important. Ces enzymes sont groupées en cinq classes : ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) et ANT(9). Elles catalysent le transfert d'un groupement adénosine monophosphate (AMP) de l'adénosine triphosphate (ATP) sur un groupement hydroxyle de l'aminoglycoside en position 2'', 3'', 4', 6 ou 9 (figure 8). Chacune de ces enzymes est spécifique d'un ou plusieurs aminoglycosides (tableau 3) (Vakulenko et Mobashery 2003). Les gènes codants pour ces enzymes sont souvent présents dans des éléments mobiles comme les transposons (Magnet et Blanchard 2005).

| Nucléotidyltransférase | Substrat(s) |
|------------------------|--|
| ANT(2'')-I | Tobramycine, gentamicine, dibécacine, sisomicine, kanamycine |
| ANT(3'')-I | Streptomycine, spectinomycine |
| ANT(4')-Ia | Tobramycine, amikacine, dibécacine, kanamycine, isepamicine |
| ANT(4')-IIa | Tobramycine, amikacine, kanamycine, isépacine |
| ANT(6')-I | Streptomycine |
| ANT(9)-I | Spectinomycine |

Tableau 3 : Profils de substrats des nucléotidyltransférases

Deux structures d'aminoglycosides nucléotidyltransférases ont été résolues par cristallographie aux rayons X. Il s'agit de l'ANT(4') de *S. Aureus* (1KNY), première structure d'enzyme de modification des aminoglycosides résolue (Pedersen *et al.* 1995), et de l'ANT(6) de *Bacillus subtilis* (2PBE – non publié) résolue plus récemment (figure 9). L'ANT(4'), cristallisée en présence de ces deux substrats (kanamycine et ATP), est active sous forme dimérique, le site actif se situant à l'interface des deux monomères. Chaque monomère interagit avec les substrats et les stabilise. La structure de ce complexe indique un mécanisme indépendant, avec une attaque nucléophile directe du groupement hydroxyle sur le phosphate de l'ATP. Aucune structure de complexe entre l'ANT(6) et ses substrats n'a été résolue à ce jour.

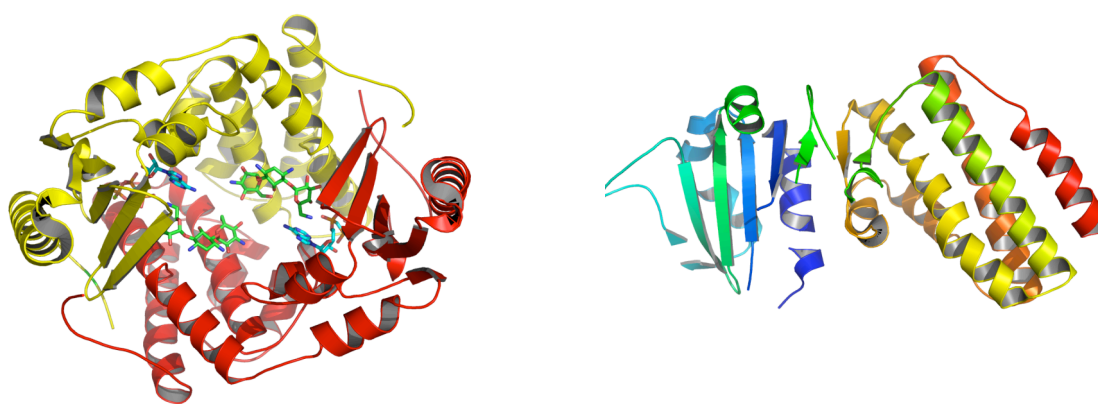


Figure 9 : Structures cristallographiques d'ANT. A gauche : structure de l'ANT(4') (1KNY) complexée avec la kanamycine et l'ATP, les monomères sont colorés en rouge et jaune, la kanamycine et l'ATP sont colorés par type d'atome avec les carbones en vert pour la kanamycine et en cyan pour l'ATP. A droite structure de l'ANT(6) (2PBE)

b) Les phosphotransférases (APH)

Les aminoglycosides phosphotransférases catalysent le transfert d'un groupement phosphoryl de l'ATP sur une des positions hydroxylées des aminoglycosides (figure 8). Elles ont une importance clinique particulièrement chez les Entérocoques et les Staphylocoques. Sept classes de phosphotransférases ont été isolées, l'APH(3'), APH(2''), APH(3''), APH(4), APH(7''), APH(6) et APH(9), la plus importante étant la classe des APH(3'). Les profils de substrats des APH sont résumés dans le tableau 4. Sept différents types d'APH(3') ont été identifiés et deux structures ont été résolues par cristallographie, l'APH(3')-IIIa (Fong et Berghuis 2002) et l'APH(3')-IIa (Nurizzo *et al.* 2003) (figure 10). Ces études structurales ont montré que ces enzymes avaient un domaine structural commun avec les sérine/thréonine et tyrosine kinases. Le résidu Asp190 appartenant à la boucle du site de fixation de l'ATP a été

identifié comme étant le résidu catalytique responsable de la perte préliminaire du proton hydroxyl des aminoglycosides.

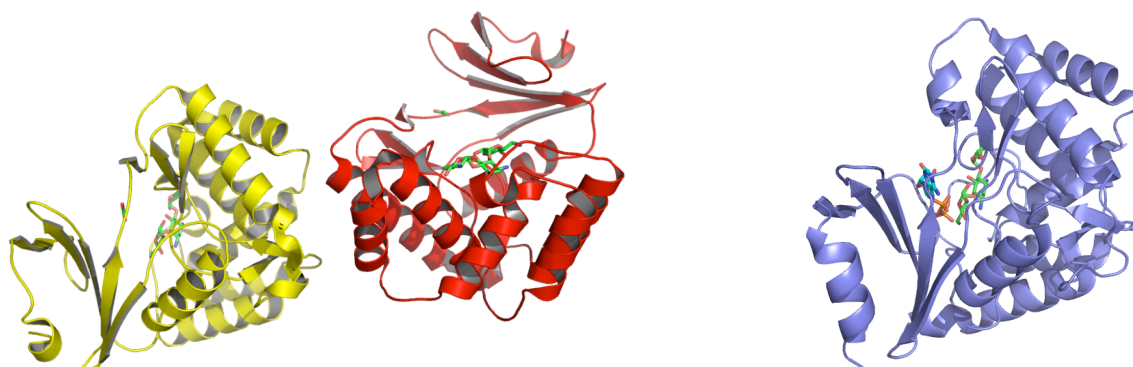


Figure 10 : Structures d'APH résolues par cristallographie. A gauche l'APH(3')-IIIa complexée avec la kanamycine (1ND4) colorée par monomères. A droite l'APH(3')-IIa complexée avec l'ADP et la kanamycine (1L8T). La kanamycine est colorée par type d'atome avec les carbones verts dans les deux structures, l'ADP est coloré par type d'atome avec les carbones en cyan.

| Phosphotransférase | Substrat(s) |
|--------------------------|--|
| APH(3') | |
| I | Kanamycine, néomycine, lividomycine, paromomycine, ribostamycine |
| II | Kanamycine, néomycine, butirosine, paromomycine, ribostamycine |
| III | Kanamycine, néomycine, lividomycine, paromomycine, ribostamycine, butirosine, amikacine, isépamicine |
| IV | Kanamycine, néomycine, butirosine, paromomycine, ribostamycine |
| V | Néomycine, paromomycine, ribostamycine |
| VI | Kanamycine, néomycine, paromomycine, ribostamycine, butirosine, amikacine, isépamicine |
| VII | Kanamycine, néomycine |
| APH(2'') | |
| Ia (bifonctionnelle) | Kanamycine, gentamicine, tobramycine, sisomicine, dibékacine |
| Ib, Id | Kanamycine, gentamicine, tobramycine, nétilmicine, dibékacine |
| Ic | Kanamycine, gentamicine, tobramycine |
| APH(3'')-Ia, -Ib | Streptomycine |
| APH(7'')-Ia | Hygromycine |
| APH(4)-Ia, -Ib | Hygromycine |
| APH(6)-Ia, -Ib, -Ic, -Id | Streptomycine |
| APH(9)-Ia, -Ib | Spectinomycine |

Tableau 4 : Profils de substrats des phosphotransférases

c) Les acétyltransférases (AAC)

Les acétyltransférases représentent la plus grande classe d'enzymes de modification des aminoglycosides. Elles catalysent le transfert d'un groupement acétyl de l'acétyl coenzyme A (acétyl CoA) sur les positions aminées des aminoglycosides (figure 8). Il existe 4 classes d'acétyltransférases, les AAC(1), AAC(3), AAC(2') et AAC(6'). Cette dernière sous-classe, la plus grande avec 26 gènes différents isolés à ce jour, est le mode de résistance le plus fréquemment rencontré parmi les AAC. Elle fera l'objet du chapitre V. Les profils de substrats des différentes aminoglycosides acétyltransférases sont résumés dans le tableau 5.

Deux AAC(1) ont été identifiées chez des souches d'*E. coli* (Lovering *et al.* 1987) et d'*Actinomycète* (Sunada *et al.* 1999) mais leur importance clinique est très faible. En effet, l'AAC(1) d'*E. coli* n'acétyle pas les aminoglycosides utilisés classiquement en clinique et l'AAC(1) d'*Actinomycète*, qui a un profil de substrats plus large, n'est pas retrouvée chez les bactéries pathogènes pour l'homme.

| Acétyltransférase | Substrat(s) |
|-------------------|---|
| AAC(6') | |
| I | Tobramycine, amikacine, nétilmicine, dibékacine, sisomicine, kanamycine, isépamicine |
| II | Tobramycine, gentamicine, nétilmicine, dibékacine, sisomicine, kanamycine |
| AAC(3) | |
| Ia, Ib | Gentamicine, sisomicine, fortimicine |
| IIa, IIb, IIc, | Tobramycine, gentamicine, nétilmicine, dibékacine, sisomicine |
| IIIa, IIIb, IIIc | Tobramycine, gentamicine, dibékacine, sisomicine, kanamycine, néomycine, paromomycine, lividomycine |
| IV | Tobramycine, gentamicine, nétilmicine, dibékacine, sisomicine, apramycine |
| VI | Gentamicine, 6'-N-éthylnétilmicine |
| VII | Gentamicine |
| AAC(1) | Paromomycine, lividomycine, ribostamycine, apramycine |
| AAC(2')-Ia | Tobramycine, gentamicine, nétilmicine, dibékacine, néomycine |

Tableau 5 : Profils de substrats des acétyltransférases

Les AAC(3) sont une classe importante d'aminoglycosides acétyltransférases. La structure de l'AAC(3)-la de *S. marcescens* fut la première structure d'aminoglycoside acétyltransférases résolue (Wolf *et al.* 1998) (figure 13). Le repliement de cette enzyme est typique de la super-famille des GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT). Les membres de cette famille ont en commun de catalyser le transfert d'un groupement acétyl de l'acétylcoenzyme A sur une amine portée par une grande variété de substrats. La super-famille des GNAT comporte plus de 150 protéines dont les histones acétyltransférases de levure (HAT) et humaine (PCAF), les GCN5 histones acétyltransférases de levure et de *Tetrahymena thermophila*, les sérotonines acétyltransférases (AANAT arylalkylamine N-acétyltransférase), les Esa1 histones acétyltransférases de levure, les glucosamine-phosphate N-acétyltransférases (Gna1) et les aminoglycosides acétyltransférases (Dyda *et al.* 2000; Vetting *et al.* 2005). Les membres de cette super-famille comprennent quatre motifs de séquence conservés (Motifs A, B, C et D) (figure 12). Le motif A, le plus conservé, est impliqué dans la reconnaissance de l'acétyl CoA (figure 13). Ce motif contient le feuillet $\beta 4$ jouant un rôle crucial dans la fixation de l'acétyl-CoA et contenant des résidus important pour l'activité catalytique de l'enzyme. Le repliement commun de cette famille est formé d'un feuillet central de 5 à 7 brins β antiparallèles encadré d'un côté par 2 à 3 hélices α , de l'autre par 1 à 2 hélices α (Dyda *et al.* 2000) (figure 11).

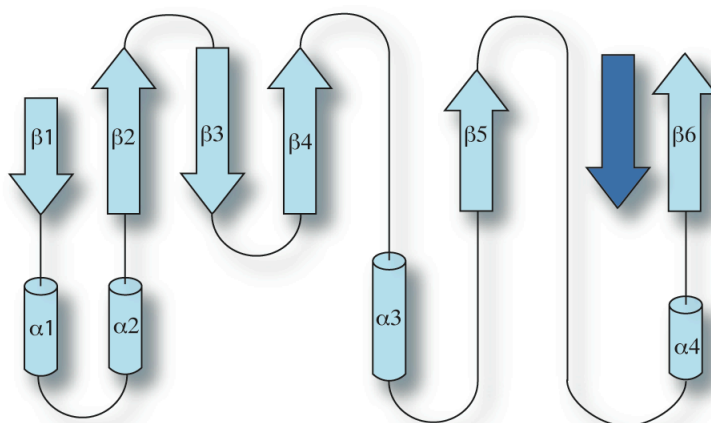


Figure 11 : Topologie du cœur de repliement commun des GNAT. Le feuillet β en C-terminal coloré en bleu foncé peut provenir du même monomère ou d'un autre.

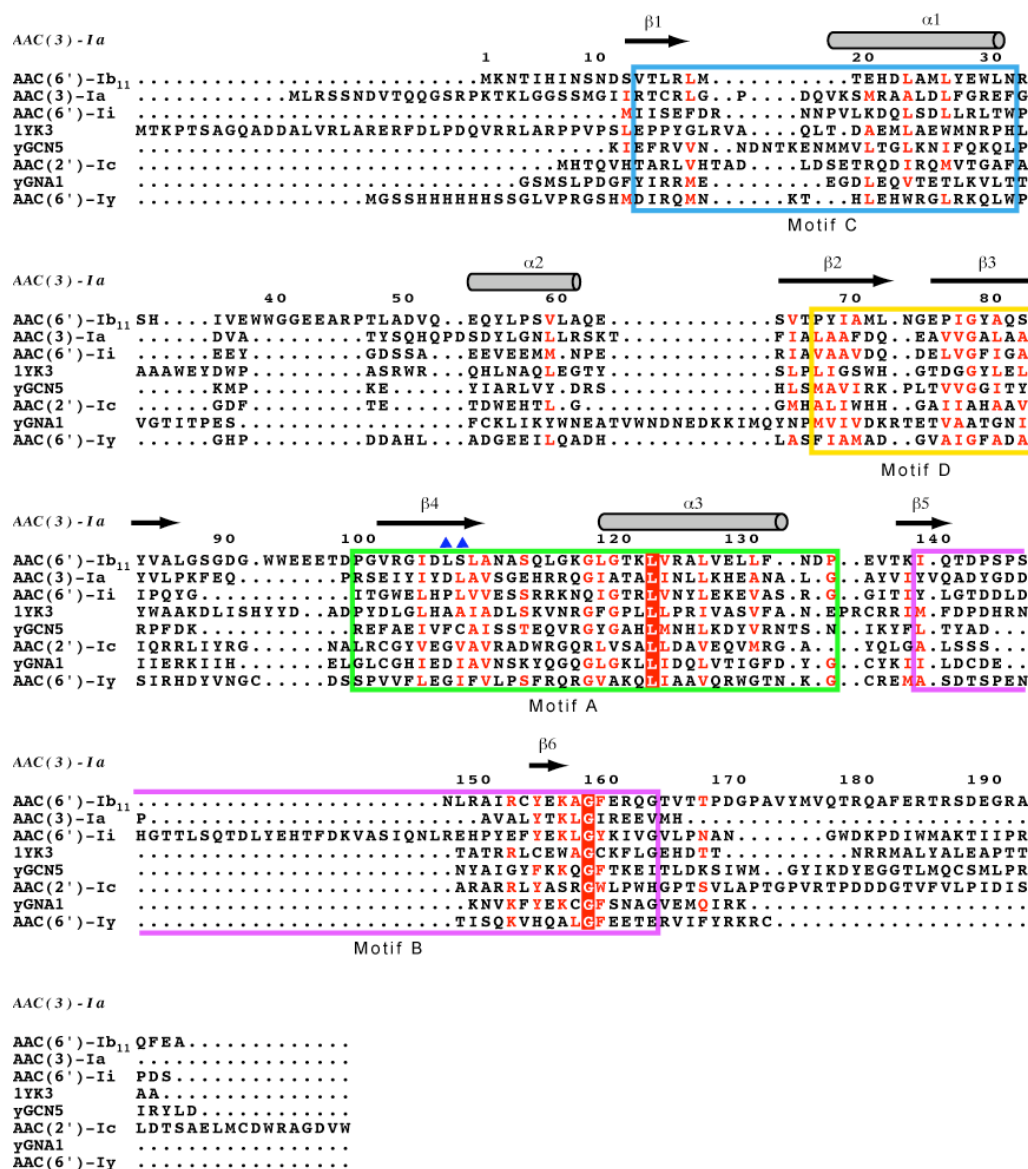


Figure 12 : Alignement de séquence d'enzymes de la super-famille des GNAT sur la structure de l'AAC(3)-Ia réalisé avec VAST. Les motifs de séquence conservés A, B, C, et D dans la super-famille des GNAT sont encadrés respectivement en vert, violet, bleu et jaune. Les résidus homologues conservés ou partiellement conservés sont indiqués en rouge. Les résidus parfaitement conservés sont indiqués en blanc sur fond rouge. Les acides aminés 106 et 107 déterminant le phénotype de résistance à l'amikacine des AAC(6') sont repérés par des triangles bleus. 1yk3 : enzyme de modification des aminoglycosides hypothétique (*Mycobacterium tuberculosis*), yGCN5 : GCN5 histone acétyltransférase de levure, yGNA1 : glucosamine-phosphate N-acétyltransférase de levure

Il existe cinq classes d'AAC(2'), toutes sont codées par des gènes chromosomiques et sont spécifiques d'une espèce bactérienne. La première à avoir été étudiée est l'AAC(2')-Ia de *Providencia stuartii* (Rather et al. 1993). Des mutations au niveau du gène *aac(2')-Ia* codant pour cette protéine confèrent une diminution du niveau d'acétylation du peptidoglycane et une altération de la morphologie cellulaire. Ceci suggère que l'acétylation

du peptidoglycane peut être une fonction physiologique de cette enzyme (Payie et Clarke 1997). Ceci est confirmé par les analyses biochimiques qui montrent que l'activité enzymatique *in vitro* (V_{max}/K_m) sur les aminoglycosides n'est pas corrélée avec les valeurs de CMI (concentration minimum inhibitrice) (Franklin et Clarke 2001).

Toutes les autres AAC(2') ont été isolées dans des souches de mycobactéries. La structure de l'AAC(2')-Ic de *Mycobacterium tuberculosis* a été résolue par cristallographie aux rayons X (figure 13) (Vetting et al. 2002). Le profil de substrat de cette enzyme est large, incluant la kanamycine A et l'amikacine qui possèdent un groupement hydroxyle en 2'. Cette enzyme est donc capable de catalyser les O-acétylations contrairement aux autres acétyltransférases (Hegde et al. 2001). Bien que l'identité de séquence de cette enzyme avec les autres AAC soit faible, son repliement, commun avec l'AAC(3), confirme son appartenance à la superfamille des GNAT.

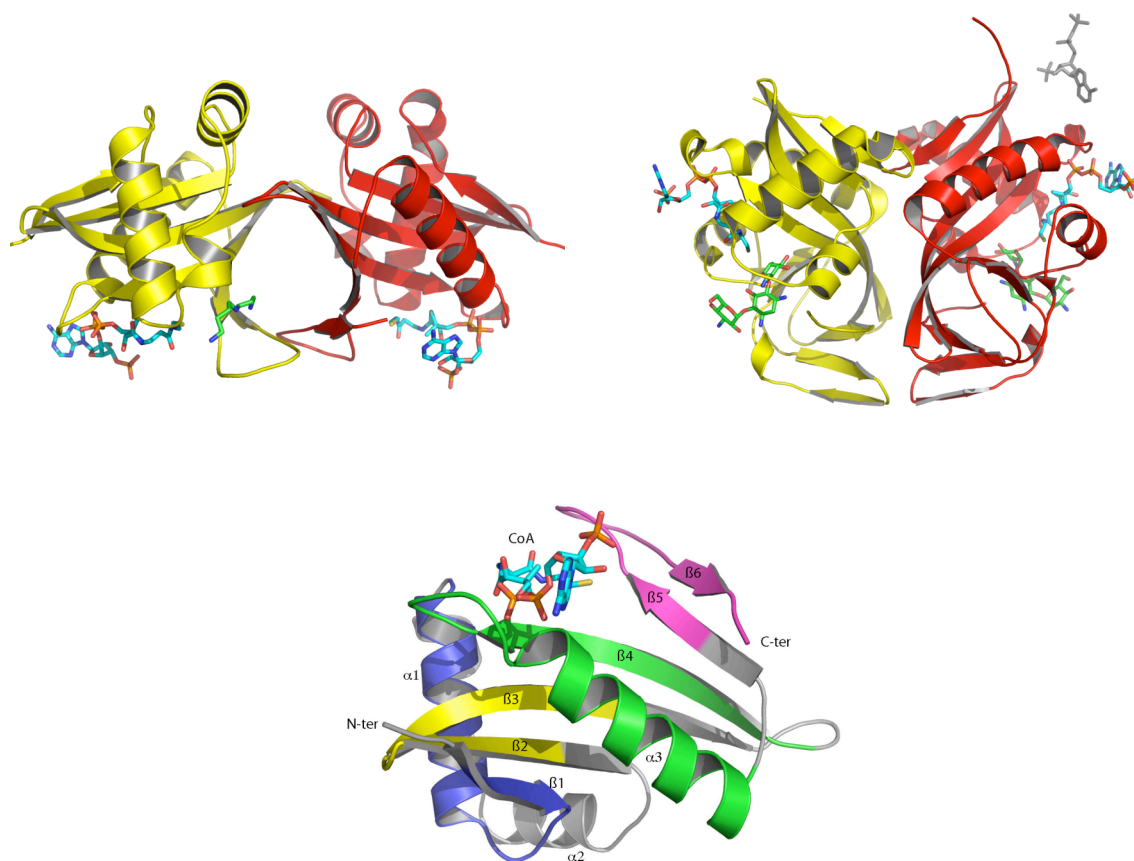


Figure 13 : En haut : structures cristallographiques de l'AAC(3)-Ia (1BO4) à gauche et de l'AAC(2')-Ic (1M4I) à droite, colorées par monomère. Le coenzyme A est coloré en fonction du type d'atome (carbones cyans). Dans l'AAC(3)-Ia une molécule de spermidine est présente dans la structure. Dans l'AAC(2')-Ic la kanamycine est colorée en fonction du type d'atome (carbones verts) et une molécule 3'-phosphate adénosine 5'-diphosphate est présente dans la structure (colorée en gris). En dessous : représentation des motifs de séquence des GNAT sur la structure du monomère de l'AAC(3)-Ia. Les motifs C, D, A, B (N-ter au C-ter) sont colorés respectivement en bleu, jaune, vert et violet.

d) Les enzymes bifonctionnelles

Les enzymes bifonctionnelles sont en général rares chez les bactéries. Quatre d'entre elles ont été découvertes jusqu'à aujourd'hui : l'AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia, l'ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId, l'AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib', et l'AAC(6')-30/AAC(6')-Ib'. Seules l'AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' et l'ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId ont été étudiées du point de vue de la cinétique enzymatique.

Le gène *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, généralement présent sur des transposons, code pour l'enzyme bifonctionnelle AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia. Chaque domaine enzymatique agit indépendamment et cette enzyme confère une résistance à large spectre et de haut niveau aux aminoglycosides chez les Entérocoques et les Staphylocoques. Elle est monomérique en solution et peut acétyler tous les aminoglycosides (excepté la streptomycine) y compris ceux possédant un groupement hydroxyl en 6' (Daigle *et al.* 1999). Cette capacité d'O-acétylation est rendue possible par la présence de l'aspartate 99 qui permet la déprotonation du groupement hydroxyl (Boehr *et al.* 2003).

Le gène *aac(6')-30/aac(6')-Ib'* a été isolé chez *Pseudomonas aeruginosa*. La séquence de l'AAC(6')-Ib' initialement décrite correspond à celle de l'AAC(6')-Ib avec la mutation caractéristique leucine 107 en serine (figure 12) qui confère le phénotype de résistance des AAC(6')-II c'est à dire la résistance à la gentamicine mais pas à la l'amikacine (Rather *et al.* 1992 ; Lambert *et al.* 1994). Ici la séquence porte en plus une mutation D188V (Mendes *et al.* 2004).

L'enzyme bifonctionnelle AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' a été isolée chez *Pseudomonas aeruginosa* (Dubois *et al.* 2002). La séquence de l'AAC(6')-Ib' présente la substitution leucine 107 en sérine et diffère des AAC(6')-Ib préalablement décrites de trois acides aminés. Le domaine AAC(3)-Ib est hautement spécifique de la fortimicine A et de la gentamicine alors que le domaine AAC(6')-Ib' présente une spécificité de substrat plus large. Malgré la substitution L107S de la partie AAC(6')-Ib', celle-ci peut acétyler l'amikacine et la gentamicine. Son mécanisme enzymatique a été étudié. Chacun de ces domaines suit un mécanisme ordonné avec la fixation de l'acétyl coenzyme A précédant celle de l'aminoglycoside. Après le transfert du groupement acétyl, l'aminoglycoside acétylé est libéré avant le coenzyme A. Les valeurs de k_{cat}/K_m pour la partie AAC(6') sont assez élevées (de l'ordre de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) comparativement à d'autres AAC, indiquant une efficacité enzymatique *in vitro* importante (Kim *et al.* 2007).

Récemment, le gène codant pour l'enzyme bifonctionnelle ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId a été isolé chez *Serratia marcescens* (Centron et Roy 2002). Le domaine ANT est spécifique de la spectinomycine et de la streptomycine alors que le domaine AAC présente une spécificité de substrat plus large. La partie *aac(6')-IId* de ce gène ne diffère que d'une paire de base du

gène *aac(6')-Ib*. L'enzyme résultante présente la substitution leucine 107 en serine qui abolit la résistance à l'amikacine (Rather *et al.* 1992; Lambert *et al.* 1994). Son mécanisme est également ordonné pour les deux domaines mais pour la partie AAC, c'est l'antibiotique qui se fixe avant l'acétyl CoA et le CoA est libéré avant l'aminoglycoside acétylé (Kim *et al.* 2006).

e) Origines possibles des gènes de résistance enzymatique

La corrélation entre l'efficacité enzymatique *in vitro* (valeur de V_{max}/K_m) et les valeurs de CMI *in vivo* peut être utilisée pour montrer l'existence ou non d'une autre activité physiologique de l'enzyme. Il a été montré que cette corrélation existait pour les souches portant les gènes des enzymes de résistance sur des éléments mobiles (plasmides, transposons, intégrons) alors qu'elle n'existait pas pour les souches portant ces gènes sur des chromosomes. Ceci suggère que les enzymes codées par des éléments génétiques mobiles ont évolué pour améliorer leur efficacité de modification des aminoglycosides et ont été disséminées dans ce but. Les enzymes codées par des gènes chromosomiques auraient d'autres fonctions physiologiques dans la bactérie (Williams et Northrop 1978). D'autre part, de nombreuses propositions ont été faites pour expliquer l'origine possible des gènes de résistance aux aminoglycosides. Le problème reste complexe, le nombre de gènes étant très important. Plusieurs origines existent y compris pour une même classe d'enzyme (Rather 1998).

En 1973, plusieurs études ont suggéré que les gènes de résistance aux aminoglycosides pouvaient provenir des organismes producteurs d'aminoglycosides (Benveniste et Davies 1973 ; Walker et Skorvaga 1973). Ces gènes de résistance ont probablement évolué en parallèle avec les gènes de biosynthèse des aminoglycosides pour conférer à la bactérie une protection contre ces composés toxiques (Cundliffe 1989). Les organismes producteurs d'aminoglycosides sont également responsables d'une source inattendue de résistance. Il a été montré que des préparations d'aminoglycosides pouvaient contenir de l'ADN incluant le gène de résistance intrinsèque de la bactérie productrice. Les antibiotiques eux-mêmes sont donc une source potentielle d'acquisition de la résistance par les isolats cliniques (Webb et Davies 1993).

Une autre étude propose que les gènes de résistance aux aminoglycosides proviendraient de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire (Piepersberg W 1988). Les enzymes de modification dériveraient d'enzymes impliquées dans le métabolisme intermédiaire des composés à faible poids moléculaire. De plus, ces gènes pourraient également dériver d'enzymes impliquées dans des fonctions du métabolisme primaire

comme la synthèse macromoléculaire, la régulation du transport ou la morphogénèse. Les phosphotransférases présentent des résidus communs hautement conservés (Brenner 1987) et des similarités structurales (Fong et Berghuis 2002) avec les sérine/thréonine et les tyrosine kinases eucaryotes indiquant une évolution commune. Les phosphotransférases sont aussi impliquées dans la biosynthèse d'aminoglycosides comme la streptomycine et peuvent avoir évolué à partir de cette biosynthèse (Rather 1998).

Pour les nucléotidyltransférases, la structure de l'ANT(4')-I a montré que cette enzyme appartenait à une famille de nucléotidyltransférases reliées à l'ADN polymérase β (Holm et Sander 1995). Malgré une faible homologie de séquence, l'analyse structurale indique une similitude dans la structure tridimensionnelle. De plus, ces deux enzymes catalysent la même réaction, c'est-à-dire l'addition de nucléosides triphosphates sur des groupements hydroxyles.

Pour les acétyltransférases, il existe des similarités avec les protéines Rim impliquées dans l'acétylation de protéines ribosomiques (Piepersberg W 1988). Cette similarité est particulièrement importante pour les extrémités C-terminales de l'AAC(3)-Ia et l'AAC(6')-Ia et la protéine RimI. D'autres études suggèrent que l'AAC(3)-III intrinsèque de *Mycobacterium fortuitum* joue un rôle dans la synthèse des intermédiaires du cycle de Krebs (Udou *et al.* 1989). Cette enzyme peut convertir un oxaloacétate en citrate par une réaction de condensation avec l'acétyl CoA. De plus, l'addition de tobramycine peut inhiber cette réaction. Pourtant la similarité structurale entre les substrats (protéines ribosomiques et oxaloacetate avec les aminoglycosides) est très limitée.

Une autre possibilité est que ces enzymes de modification des aminoglycosides dérivent d'enzymes qui modifieraient des substrats semblables aux aminoglycosides comme les N-acétylglucosamines ou l'acide N-acétylmuramique. Ces deux molécules sont des sucres aminés contenant des groupements acétyls. Le peptidoglycane ou les lipopolysaccharides (LPS) contiennent des polymères de ces sucres aminés. Les acétyltransférases joueraient alors un rôle intrinsèque dans le métabolisme du peptidoglycane ou des LPS (Rather *et al.* 1993 ; Payie et Clarke 1997).

B) Epidémiologie de la résistance

La résistance des isolats cliniques aux aminoglycosides varie selon l'aminoglycoside utilisé, le microorganisme, le mécanisme de résistance impliqué, ou encore la zone géographique. Cette résistance est le plus souvent due à une enzyme de modification sauf pour deux espèces bactériennes. En effet, une forte proportion d'isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance aux aminoglycosides provoquée par une

diminution de la pénétration de l'antibiotique dans la cellule. Pour *Mycobacterium tuberculosis*, le mécanisme principal de résistance aux aminoglycosides est la mutation de l'ARN ribosomique.

La prévalence de chaque enzyme de modification est fortement corrélée à l'utilisation faite de l'antibiotique correspondant. Par exemple, aux Etats-Unis où la gentamicine est l'aminoside le plus utilisé (80%), le gène codant pour l'ANT(2'')-Ia (conférant la résistance à la gentamicine mais pas à l'amikacine) est présent dans 81% des entérobactéries résistantes aux aminoglycosides. Au contraire, au Japon où l'amikacine est bien plus utilisée que la gentamicine, ce gène est présent dans moins de 50% des isolats cliniques (Miller *et al.* 1997). De la même manière dans les pays d'Europe qui utilisent plus fréquemment l'amikacine comme la Belgique, la France ou la Grèce, les AAC(6')-I ont une incidence très élevée, ces enzymes conférant une résistance de haut niveau à l'amikacine. En revanche en Allemagne, où la gentamicine représente 80% des prescriptions d'aminosides, le mécanisme principal de résistance est due aux ANT(2'')-I puis aux AAC(3)-IV, ces enzymes conférant la résistance à la gentamicine.

Les gènes codant pour les enzymes de modifications sont le plus souvent présents sur des plasmides ou des transposons entre des gènes codant pour la résistance à d'autres classes d'antibiotiques. La consommation des autres antibiotiques non aminoglycosidiques peut alors influencer significativement l'épidémiologie de la résistance aux aminoglycosides (Vakulenko et Mobashery 2003).

C) Stratégies de contournement de la résistance aux aminoglycosides

1) Nouveaux aminoglycosides

La conception de nouveaux aminoglycosides conçus pour échapper à la résistance a déjà été couronnée de succès. Le principe repose sur une modification chimique d'un aminoglycoside déjà existant permettant de conserver son activité antibiotique mais de diminuer son affinité pour les enzymes de résistance. La dibékacine (3',4'-didéoxykanamycineB) est le premier aminoglycoside conçu rationnellement pour échapper aux enzymes de résistance (figure 14). La perte des groupements hydroxyls en 3' et 4' empêche sa modification par les APH(3') et les ANT(4')-Ia. La dibékacine reste cependant inactivée par les ANT(2'') (Schmidt *et al.* 1988) et par une nouvelle ANT(4')(4'') isolée chez *Enterococcus faecium* (Carlier et Courvalin 1990). La tobramycine est également conçue sur le même principe, elle n'est pas modifiée par les APH(3'). D'autres modifications d'aminoglycosides ont été effectuées comme l'addition d'un groupement 4-amino-2-hydroxybutyrique (AHB) sur l'amine en position 1 du cycle central (figure 14). L'ajout de ce

groupement sur la kanamycine conduit à l'amikacine. L'arbékacine, active sur les souches de SARM, s'obtient également en ajoutant un groupement AHB sur la dibékacine (Kondo *et al.* 1973; Inoue *et al.* 1994). La présence de cette longue chaîne AHB sur les aminoglycosides empêche donc leur fixation sur certaines enzymes de résistance par encombrement stérique ce qui augmente leur efficacité contre les bactéries productrices de ces enzymes (Kondo et Hotta 1999). Cependant, ces modifications n'empêchent pas la fixation sur toutes les enzymes de modifications existantes et de nouvelles enzymes capables de modifier ces nouveaux aminoglycosides apparaissent. Ainsi, l'arbékacine reste modifiée par l'enzyme bifonctionnelle AAC(6')-li-APH(2'')-Ia et par une nouvelle enzyme modifiant la position 4''' (Fujimura *et al.* 2000). L'amikacine, bien que beaucoup moins modifiée par les enzymes que son précurseur la kanamycine, reste acétylable par les AAC(6') du groupe I (Kondo et Hotta 1999) (figure 14).

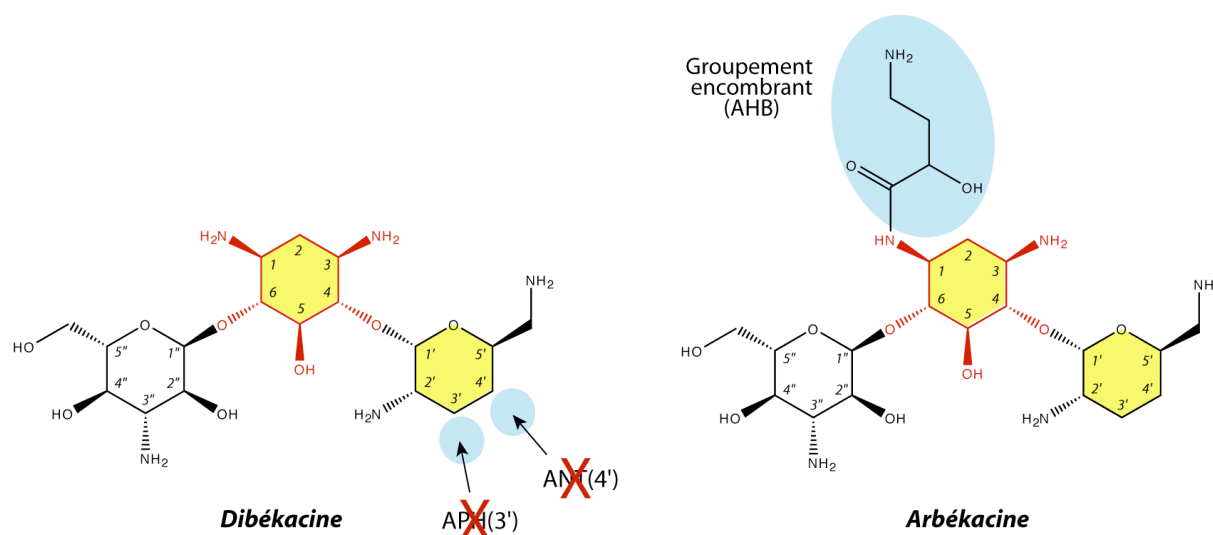


Figure 14 : Structures de la dibékacine et de l'arbékacine, conçues pour échapper aux mécanismes de résistance enzymatique.

Des dérivés de néamine ont également montré une activité antibiotique importante y compris sur des souches exprimant des enzymes de résistance (l'APH(3')-I et l'AAC(6')/APH(2'')). Ces molécules ont été construites par criblage virtuel d'une banque de molécules (273 000 composés). Les meilleures structures de molécules sont alors ajoutées par synthèse sur la néamine pour former un nouvel antibiotique (Haddad *et al.* 2002).

Des dimères de néamine ont également été synthétisés. Ces molécules conservent leur activité antibiotique en se fixant au site A de façon bivalente avec des constantes de dissociation de l'ordre du nanomolaire. Les cycles 2-DOS de chaque partie néamine sont

reliés par une chaîne carbonée diaminée. Selon la taille et la nature de ce lien, ces aminoglycosides dimériques sont également inhibiteurs de l'activité phosphotransférase de l'enzyme bifonctionnelle AAC(6')-APH(2'') (Agnelli *et al.* 2004). D'autres aminoglycosides dimériques associant la néomycine et la kanamycine A ou la néomycine et la tobramycine ont été construits. L'activité antibiotique de ces composés dimériques est supérieure à l'activité d'une double concentration de l'antibiotique monomérique (Michael *et al.* 1999).

D'autres dérivés d'aminoglycosides sont actifs sur des souches résistantes tout en ayant une forte affinité pour les enzymes de résistance. Par exemple, la 3'-oxo-kanamycine a une forte affinité pour les enzymes APH(3') mais elle est auto-régénérée. En effet, le composé phosphorylé résultant de l'action de l'enzyme est très instable et reforme rapidement le produit de départ (figure 15a) (Haddad *et al.* 1999). Le même principe avait déjà été utilisé pour la 2-nitrokanamycine (Roestamadji *et al.* 1995).

Récemment, des dérivés fluorés d'aminoglycosides ont été décrits (Kim *et al.* 2004). La 4',4'-difluorokanamycine est active sur des souches exprimant les APH(3'). La présence du fluor très électro-négatif fait diminuer la nucléophilie du groupement hydroxyl adjacent (3'). La constante cinétique de l'enzyme (k_{cat}) pour la phosphorylation en 3' est alors trois fois plus faible.

Cette stratégie de recherche de nouveaux aminoglycosides dérivés de ceux déjà existants présente deux inconvénients majeurs. Le premier est que les enzymes de modifications s'adaptent généralement assez rapidement à ces antibiotiques, structuralement proches des aminoglycosides déjà existants. Le deuxième inconvénient est que cette conception de nouveaux aminoglycosides est limitée par la difficulté de synthèse de ces molécules. En effet, la synthèse de la désoxystreptamine, cycle central des aminoglycosides, et de ses dérivés est particulièrement longue et délicate. Elle possède un plan de symétrie interne et de nombreux groupes fonctionnels. Cette molécule peut s'obtenir par acidolyse de la néomycine B (produite par les bactéries) mais la désoxystreptamine étant parfaitement symétrique sa fonctionnalisation sélective s'avère difficile. Pour remédier à ce problème, la désoxystreptamine peut être synthétisée sous sa forme sélectivement protégée. Mais cette synthèse nécessite 14 étapes et le rendement de production n'est que de 6% (Busscher *et al.* 2004). La recherche de nouveaux dérivés de cette molécule est donc limitée par cette chimie lourde.

Une autre approche consiste à simplifier la structure des aminoglycosides en remplaçant certains cycles par des mimes moins complexes. Cette approche est guidée par les différentes structures de complexes entre des aminoglycosides et des ARN. Hermann *et al.* ont ainsi remplacé le motif 2-désoxystreptamine par des azépanes (hétérocycle à 7 carbones)

(Barluenga *et al.* 2043). Ces composés ont des activités antibiotiques modérées mais sont actifs sur des souches bactériennes résistantes. D'autres analogues font intervenir un motif 3,5-diaminopipéridinyl (DAP) pour mimer les amines 1,3 *cis* du DOS impliquées dans la reconnaissance avec le site A de l'ARN 16S bactérien. Deux motifs DAP sont reliés par une triazine, sur laquelle sont branchés divers substituants cycliques, acycliques, ou aromatiques. La faible complexité structurale comparée à celle des aminoglycosides a permis de construire une librairie par synthèses en parallèle. Certains composés obtenus ont des activités intéressantes sur des souches résistantes, et ont une moindre toxicité pour les cellules humaines (Zhou Y. 2005) (Zhou Y. 2006). Rando *et al* ont également isolé deux aminols très simples fixant le site A avec des constantes de dissociation similaires à celle de la paromomycine (composés A et B, figure 15b). Ils ont criblé une soixantaine de molécules commerciales par un test de compétition avec de la paromomycine greffée d'un pyrène fluorescent. Une autre équipe a elle testé environ 10000 composés de leur banque de molécules par un criblage RMN sur le site A et a pu identifier des motifs 2-aminobenzimidazol, 2-aminoquinoline et 2-aminopyridine possédant de bonnes affinités pour le site A (Yu *et al.* 2003).

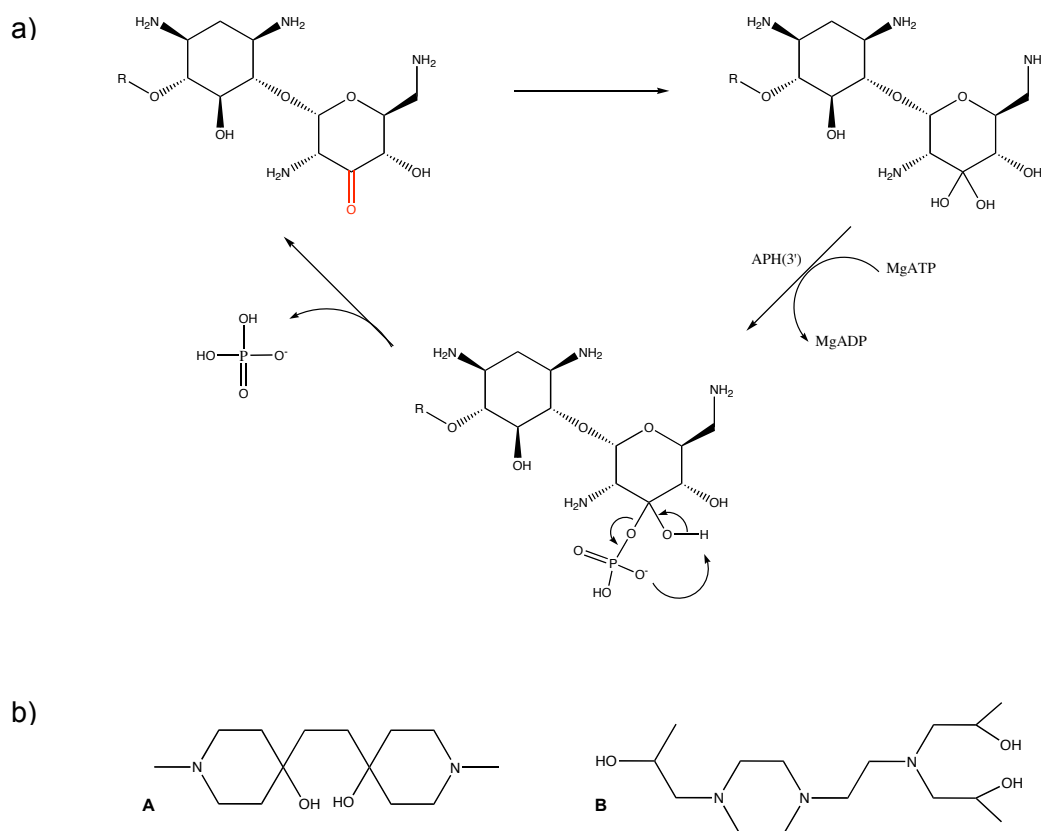


Figure 15 : a) Mode d'action de la 3'-oxo-kanamycine, inhibiteur de phosphotransférase.
b) Structures des aminols fixant le site A.

2) Inhibiteurs d'enzymes de résistance

La conception d'inhibiteurs d'enzymes de résistance a prouvé son efficacité avec les inhibiteurs des β -lactamases, utilisés largement en clinique en association avec les antibiotiques du groupe des β -lactamines. L'Augmentin[®] par exemple est composé d'amoxicilline, antibiotique de la classe des β -lactamines, et d'acide clavulanique, inhibiteur des β -lactamases (Leigh *et al.* 1981; Roselle *et al.* 1985). Il n'existe pas à l'heure actuelle d'inhibiteurs d'enzymes de résistance aux aminoglycosides utilisés en clinique comme le sont largement les inhibiteurs de β -lactamases. La conception d'un inhibiteur à spectre large s'avère difficile compte tenu du grand nombre d'enzymes existant (plus de 70 dans les trois classes) et de la diversité structurale de leurs sites actifs. Cependant les informations structurales disponibles et à venir permettent d'imaginer la conception d'inhibiteurs actifs sur une famille d'enzymes.

Les inhibiteurs d'enzymes de résistance peuvent cibler le site de liaison des aminoglycosides, celui du cofacteur (coenzyme A, ATP, ADP) ou les deux sites de liaison en même temps. Le premier inhibiteur découvert est un inhibiteur bisubstrat kanamycine-CoenzymeA obtenu par hémisynthèse (Williams et Northrop 1979). Ce composé inhibe l'activité acétyltransférase avec une constante d'inhibition de 9 nM mais ne restaure pas la sensibilité des souches productrices d'acétyltransférases aux aminoglycosides. Ceci est dû à l'incapacité de cette molécule à pénétrer dans la cellule. D'autres inhibiteurs bisubstrats ont été synthétisés à partir d'aminoglycosides et de CoA (Gao *et al.* 2005 ; Gao *et al.* 2006) ou encore à partir de la néamine et d'une adénosine (figure 16) (Liu *et al.* 2000), développés à l'aide des informations apportées par la structure du complexe entre l'APH(3')-III et l'ADP (Thompson *et al.* 1999).

En 1982, il a été montré que la 7-hydroxytropolone, composé naturel, inhibait l'activité de l'ANT(2'') et restaurait la sensibilité des souches d'*E. coli* exprimant le gène ant(2'') (Allen *et al.* 1982) (figure 16).

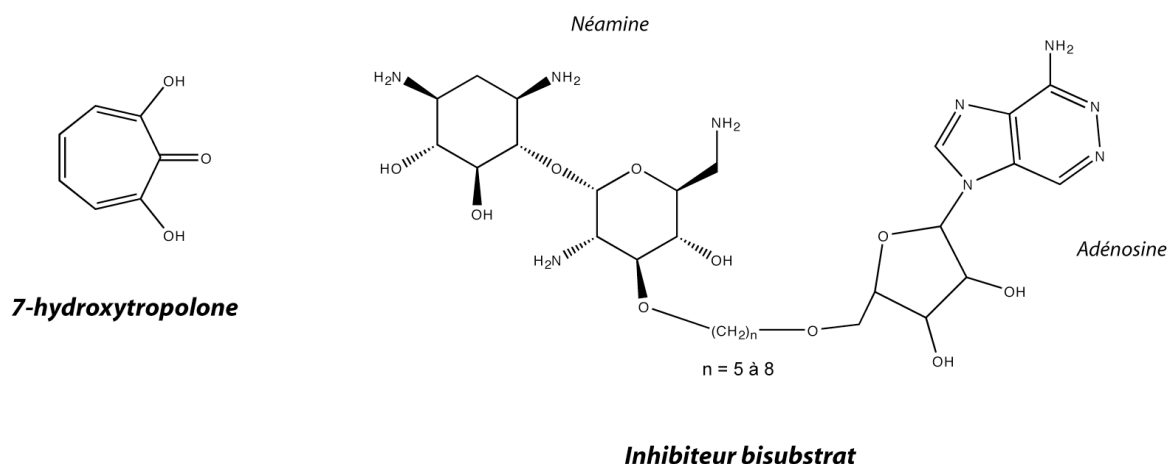


Figure 16 : Structures de composés inhibiteurs d'enzymes de résistance aux aminoglycosides. A gauche la 7-hydroxytropolone, à droite la structure de base des inhibiteurs bisubstrats néamine-adénosine

D'autres inhibiteurs non dérivés d'aminoglycosides et non cycliques ont été synthétisés. Une première approche s'appuie sur la synthèse de molécules non-cycliques conservant le motif 1,3-diamine de la désoxystreptamine (figure 17) (Welch *et al.* 2005). L'action inhibitrice de ces molécules a été testée *in vitro* sur trois enzymes de modification, l'APH(3'), l'ANT(2'') et l'AAC(3). L'une de ces molécules (composé H,I) inhibe environ 50% de l'activité enzymatique des trois enzymes testées (figure 16).

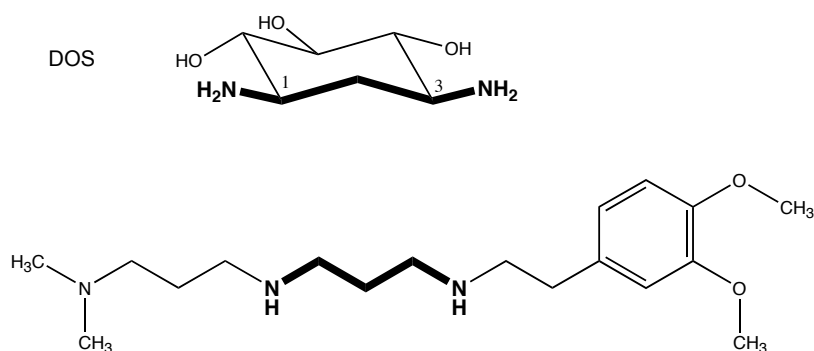


Figure 17 : Structure de la désoxystreptamine (en haut) et de l'inhibiteur H,I. La partie 1,3 diamine conservée est représentée en caractère gras.

Une autre approche s'appuie sur le fait que le site de fixation des aminoglycosides soit particulièrement chargé négativement (observé dans les structures des AAC(6')-Ii et AAC(6')-Iy). Les peptides cationiques pourraient alors être de bons ligands de ces enzymes. Une série de peptides relativement courts (12 à 24 résidus) et très chargés positivement (charge de +4 à +9) a été synthétisée et leur activité inhibitrice a été testée. Certains d'entre eux ont montré une activité inhibitrice de l'AAC(6')-Ii, de l'APH(3'')-IIa et de l'APH(2'')-Ia avec des affinités pour ces enzymes de l'ordre du micromolaire (Boehr *et al.* 2003).

Enfin, la conception d'inhibiteurs de phosphotransférases peut s'appuyer sur les similitudes structurales entre ces enzymes et les protéines kinases. En effet plusieurs inhibiteurs ont été conçus pour cibler le site actif de ces protéines kinases, ces connaissances pourraient être transposables aux phosphotransférases. L'activité phosphotransférases des APH(3')-III et de l'AAC(6')-APH(2'') est inhibée par des inhibiteurs de Ser/Thr/Tyr kinases (Smith et Baker 2002). D'autres inhibiteurs de protéines kinases ont une activité inhibitrice de phosphotransférases comme les isoquinolines sulfonamides (inhibiteurs de caséine kinases) (Daigle *et al.* 1997).

V. Les aminoglycosides N-6'-acétyltransférases

Les structures des aminoglycosides liés au ribosome ont montré que la position 6' était importante pour la fixation des aminoglycosides sur leur cible et donc pour l'activité antibactérienne de l'antibiotique. Il n'est donc pas étonnant que cette position soit la cible d'une des classes les plus importantes d'enzyme de résistance aux aminoglycosides, les AAC(6'). Ces enzymes ont un spectre d'activité très large, elles peuvent acétyler la majorité des aminoglycosides utilisés en clinique. Deux sous-classes composent cette catégorie d'acétyltransférase : les AAC(6')-I et les AAC(6')-II. Leur différence repose sur leur profil de substrat, les AAC(6')-I peuvent acétyler l'amikacine mais pas la gentamicine alors que le profil des AAC(6')-II est inversé, c'est-à-dire qu'elles peuvent acétyler la gentamicine mais pas l'amikacine. Les gènes codant pour au moins 26 enzymes du groupe I ont été identifiés alors que seulement deux enzymes du groupe II sont connues.

Les AAC(6')-IIa et AAC(6')-IIb existent uniquement chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens*. Elles possèdent une identité de séquence de 66% et confèrent la résistance à la gentamicine, la tobramycine, la nétilmicine, la sisomycine et la dibécacine. Bien que ces enzymes n'aient été que très rarement retrouvées initialement, elles apparaissent maintenant plus fréquemment dans les cas de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux aminoglycosides (Miller *et al.* 1997 ; Over *et al.* 2001).

1) Etudes structurales

Deux AAC(6')-I codées par des gènes chromosomiques et spécifiques d'une espèce ont été plus particulièrement étudiées. Il s'agit de l'AAC(6')-Iy de *S. enterica* et de l'AAC(6')-li de *E. faecium* dont les structures ont été résolues par cristallographie aux rayons X.

a) L'AAC(6')-li

L'AAC(6')-li isolée chez *E. faecium* confère un bas niveau de résistance aux aminoglycosides. La première étude structurale d'aminoglycosides liés à l'AAC(6')-li a été réalisée par RMN pour déterminer la conformation dans le site actif de l'enzyme de deux aminoglycosides, l'isépamicine (4,6-2-DOS) et la butirosine A (4,5-2-DOS). Cette étude a montré que l'isépamicine pouvait adopter deux conformations alternées dans le site actif (DiGiammarino *et al.* 1998). Ces informations sur la conformation de l'antibiotique n'ont pu être confirmées, aucune structure contenant un aminoglycoside dans le site actif de cette enzyme n'ayant été résolue par cristallographie. Les structures cristallographiques de

l'enzyme complexée avec l'acétyl CoA ou avec le CoA ont été résolues dans 3 groupes d'espaces différents (Wybenga-Groot *et al.* 1999 ; Burk *et al.* 2003 ; Burk *et al.* 2005). Le repliement de cette enzyme est commun aux GNAT. Chaque monomère adopte une forme en V avec l' acétyl CoA positionné entre les deux bras du V (figure 18). L'acétyl CoA interagit essentiellement avec la chaîne principale de l'enzyme et avec les chaînes latérales des résidus K149 et T89. Le mécanisme cinétique de l'enzyme serait ordonné avec la fixation de l'acétyl CoA précédant celle de l'antibiotique (Draker *et al.* 2003). La comparaison des profils de substrats de cette enzyme dimérique et d'un mutant (W104A) ne formant pas le dimère a montré que les deux sites de fixation du dimère n'étaient pas équivalents et qu'il y aurait donc une coopérativité entre les deux sous unité. L'AAC(6')-II, qui présente une activité assez faible sur les aminoglycosides ($k_{cat}/K_m = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), est capable d'acétyler d'autres substrats comme certaines histones, des protéines basiques de myéline ou la ribonucléase A (Wybenga-Groot *et al.* 1999). De plus les valeurs de V_{max}/K_m pour les aminoglycosides ne sont pas corrélées avec les valeurs de CMI (concentration minimum inhibitrice). La fonction d'acétylation des aminoglycosides ne serait donc pas la fonction première de cette enzyme.

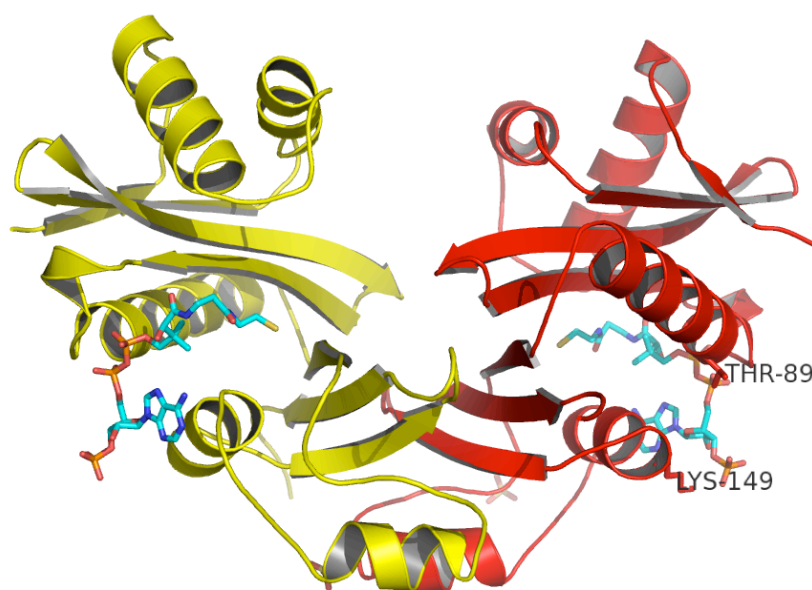


Figure 18 : Structure cristallographique du complexe AAC(6')-II / CoA (2A4N). L'enzyme est colorée par monomère, le CoA est coloré en fonction du type d'atome avec les carbones en cyan.

b) L'AAC(6')-ly

L'AAC(6')-ly, codée par un gène chromosomique, a été isolée chez une souche clinique de *Salmonella enterica* résistante aux aminoglycosides. La structure de cette enzyme de 145 acides aminés, dimérique en solution, a été résolue par cristallographie aux rayons X, complexée avec le coenzyme A et la ribostamycine (figure 19). La séquence de l'enzyme et sa structure confirment son appartenance à la famille des GNAT (Vetting *et al.* 2004). L'enzyme cristallise sous sa forme dimérique avec un échange de brin en C-terminal, ce qui n'avait jamais été observé pour les autres AAC. La structure la plus proche de cette enzyme est celle d'une histone acétyltransférase Hpa2 de *S. cerevisiae*. L'AAC(6')-ly possède un long canal, très chargé négativement, à l'interface des deux monomères et conduisant au site de fixation des aminoglycosides. La ribostamycine interagit avec chaque monomère, en particulier, les cycles aromatiques du tryptophane 22 d'un monomère et de la tyrosine 66' de l'autre monomère s'empilent de part et d'autre de celle-ci. Les cycles DOS et prime interagissent avec les chaînes latérales des résidus du site actif chargés négativement, Glu79, Asp115 et Glu136'. Un mécanisme d'acétylation a été proposé (figure 20). L'amine acétylée en 6', située à une distance de 3.4 Å de l'atome de soufre du CoA, peut attaquer directement la fonction thioester. Le résidu Asp115 jouerait le rôle de base via une molécule d'eau pour déprotoner l'amine 6' pendant l'attaque nucléophile sur la fonction thioester. La protonation de l'anion thiolate se ferait également via une molécule d'eau. La partie panthéine du coenzyme A se fixe entre les brins $\beta 4$ et $\beta 5$ (figure 19). Ces travaux ont également montré que l'enzyme pouvait fixer des peptides et qu'elle pouvait acétyler des histones eucaryotes, le peptide N-terminal de l'histone H3 humaine et enfin qu'elle pouvait s'autoacétyler. Cette enzyme apparaît donc comme dérivant du même ancêtre commun que les histones acétyltransférases eucaryotes. Le mécanisme enzymatique de cette enzyme a également été étudié. Les paramètres thermodynamiques obtenus par fluorescence ou par microcalorimétrie montrent que la fixation de l'acétyl coenzyme A ou de l'aminoglycoside s'effectue dans un ordre aléatoire (Vetting *et al.* 2004).

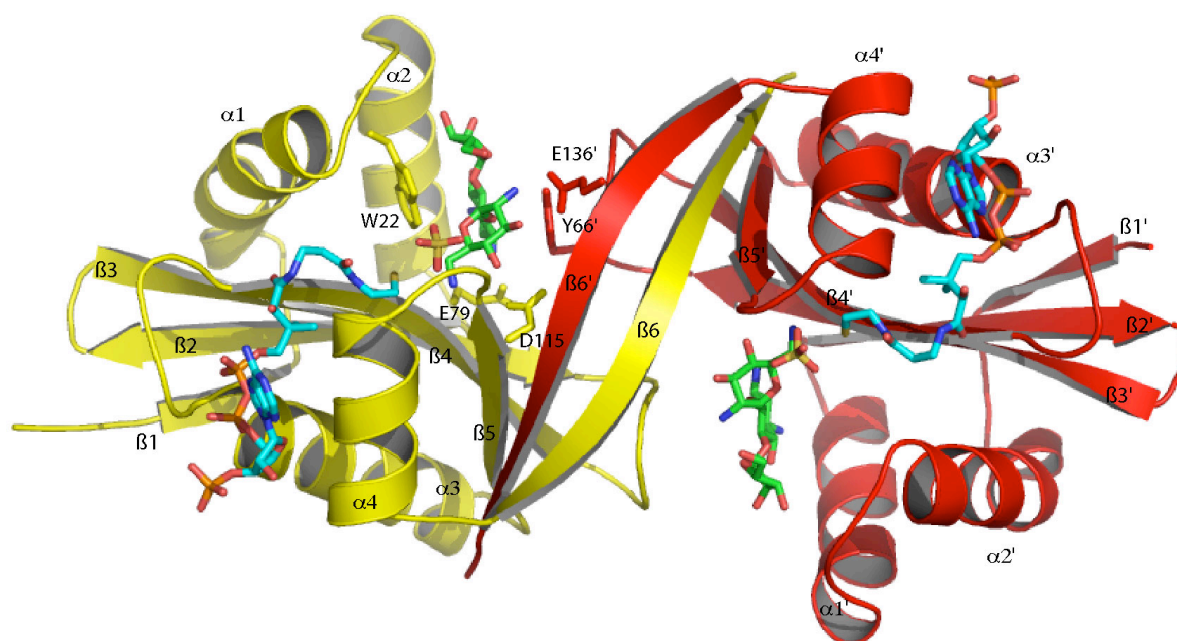


Figure 19 : Structure cristallographique de l'AAC(6')-ly complexée avec le CoA et la ribostamycine (PDB 1S3Z). L'enzyme est colorée par monomère, la ribostamycine et le CoA sont colorés par type d'atome avec les carbones en vert pour l'antibiotique, en cyan pour le CoA.

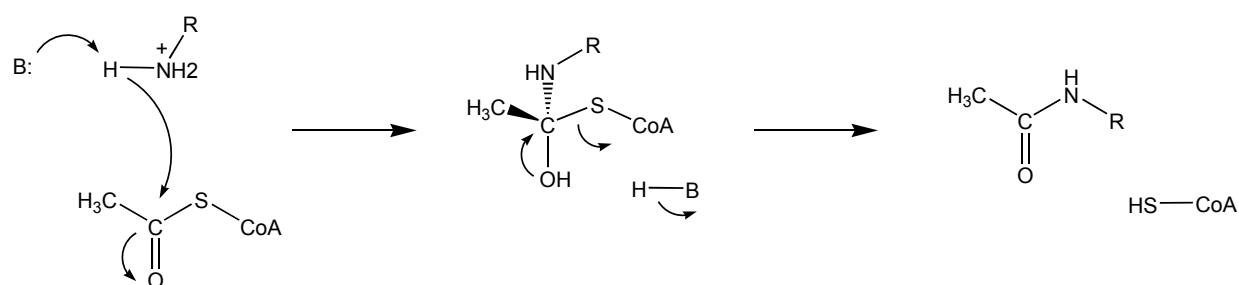


Figure 20 : Mécanisme général proposé pour la réaction d'acétylation catalysée par les AAC (et plus généralement par les GNAT). Dans le cas de l'AAC(6')-ly, la base (B sur le schéma) est le résidu D115 mais il n'attaque pas directement l'amine, la réaction s'effectue via une molécule d'eau.

2) L'AAC(6')-Ib

Parmi toutes les AAC(6'), l'AAC(6')-Ib, à laquelle nous nous sommes intéressée, est la plus répandue chez les bactéries Gram négatives. Cette enzyme est présente dans plus de 70% des bactéries Gram négative présentant le profil de résistance des AAC(6'). Le gène codant pour cette enzyme est présent sur des transposons ou des intégrons ce qui a facilité sa dissémination chez de nombreux microorganismes. Il a été initialement décrit chez *Serratia marcescens* (Tran van Nhieu et Collatz 1987) et *Klebsiella pneumoniae* (Nobuta *et al.* 1988). L'enzyme présente une faible identité de séquence avec l'AAC(6')-Iy (18,9 %) ou avec l'AAC(6')-Ii (18,1 %). De plus cette enzyme a évolué rapidement vers des mutants élargissant son spectre d'activité. Environ 30 variants du gène *aac(6')-Ib* ont été décrits depuis 1986. Plusieurs d'entre eux sont associés à d'autres gènes d'enzymes de résistance et codent pour des enzymes bifonctionnelles. Le mécanisme enzymatique de l'AAC(6')-Ib a été étudié dans le cadre de l'étude de l'enzyme bifonctionnelle AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib'. L'enzyme suit un mécanisme ordonné avec la fixation de l'acétyl CoA précédant la fixation de l'aminoglycoside puis l'acétyl aminoglycoside est libéré avant le CoA (Kim *et al.* 2007).

Nous nous sommes intéressés tout d'abord au variant codant pour l'enzyme AAC(6')-Ib₁₁ qui confère la résistance à tous les aminoglycosides. Ce variant, isolé dans un intégron de classe 1 d'une souche clinique de *Salmonella enterica* Seroovar Typhimurium en Turquie, présente un phénotype de résistance incluant l'amikacine et la gentamicine. Il regroupe donc les deux phénotypes de résistance des AAC(6')-I et II. L'enzyme présente une leucine en position 106 et une sérine en position 107 (L106, S107) (figure 21) contrairement à la séquence (Q106, L107) initialement décrite, ou (Q106, S107) décrite pour d'autres variants. Il a été montré que la combinaison de ces deux mutations conférerait un spectre de résistance élargi avec des CMI pour tous les aminoglycosides utilisés en clinique 2 à 8 fois supérieures que pour l'enzyme sauvage (Casin *et al.* 2003). D'autres études réalisées sur l'enzyme sauvage (Q106, L107) ont montré par mutagénèse dirigée que les résidus D105 et L108 étaient importants pour la conservation de la résistance à l'amikacine et à la kanamycine (Pourreza *et al.* 2005).

Nous nous sommes également intéressés au variant *aac(6')-Ib-cr*. Ce variant présente deux codons différents du gène initial, l'enzyme résultante porte les mutations W92R et D169Y (figure 21) qui confère la résistance à certaines fluoroquinolones en plus de celle aux aminoglycosides. Cependant, les CMI des aminoglycosides (kanamycine, tobramycine et amikacine) indiquent une légère perte de la résistance à ces antibiotiques. Ce variant confère donc la résistance à la ciprofloxacine et à la norfloxacine. Ces deux antibiotiques, appartenant à la classe des fluoroquinolones, sont structuralement différents des aminoglycosides et sont d'origine synthétique. C'est le premier cas de résistance

enzymatique à un antibiotique de synthèse. L'enzyme AAC(6')-Ib-cr acétyle ces deux antibiotiques sur l'amine du cycle pipérazinyl (figure 22). Les autres fluoroquinolones existantes possèdent déjà des substituants sur cette amine et ne peuvent donc pas être acétylées. Cette acétylation implique une augmentation de la CMI de ces antibiotiques d'un facteur trois ou quatre (Robicsek *et al.* 2006). L'épidémiologie de ce variant reste mal connue. Il a été remarqué pour la première fois en 2004 dans des isolats cliniques d'*Escherichia coli* en Chine (Wang *et al.* 2003). Puis il a été détecté dans plusieurs zones d'Asie et d'Amérique du nord dans différentes souches d'*Escherichia coli*, de *Klebsellia pneumoniae* ou d'enterobactéries (Robicsek *et al.* 2006).

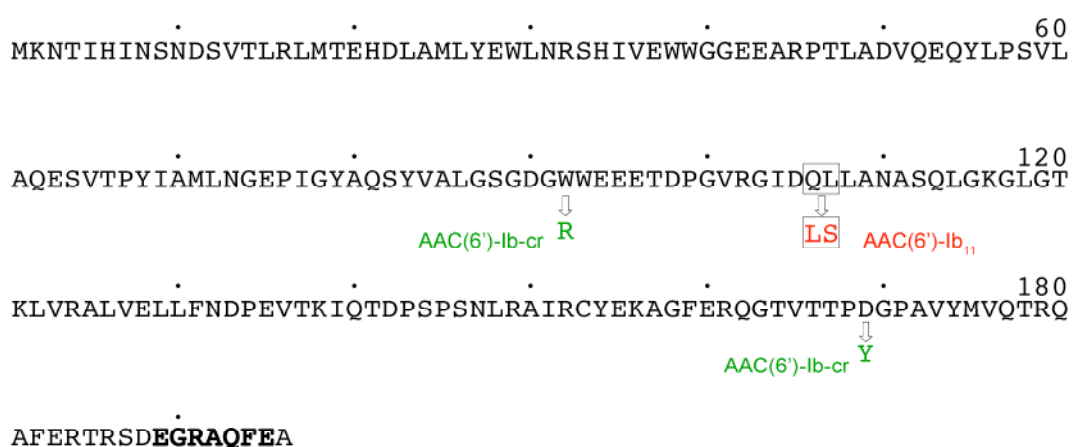


Figure 21 : Séquence de l'AAC(6')-Ib utilisée lors de cette étude. Les mutations de l'AAC(6')-Ib₁₁ sont indiquées en rouge, celle de l'AAC(6')-Ib-cr en vert. Les sept acides aminés en gras correspondent à une extension C-terminale améliorant la solubilité de l'enzyme.

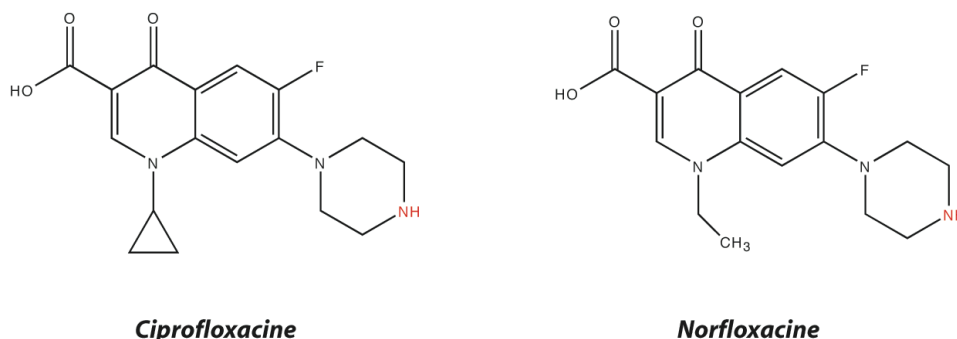


Figure 22 : Structures des fluoroquinolones acétylées par l'AAC(6')-Ib-cr. L'amine acétylée est colorée en rouge.

VI. Objectifs et présentation des résultats

Nous nous sommes intéressé à l'étude d'une des aminoglycosides acétyltransférases les plus répandues, l'AAC(6')-Ib, et à deux mutants à spectres étendus, l'AAC(6')-Ib₁₁ (conférant la résistance à tous les aminoglycosides) et l'AAC(6')-Ib-cr (conférant la résistance aux fluoroquinolones). Cette enzyme conférant une résistance élargie à plusieurs classes d'antibiotiques, le traitement des infections à bactéries exprimant cette enzyme peut s'avérer délicat. De plus cette enzyme est codée par un élément génétique mobile, ce phénotype de résistance peut alors se transmettre à plusieurs espèces bactériennes. Notre objectif était donc de rechercher de nouveaux ligands de cette enzyme, inhibiteurs potentiels de l'activité enzymatique, qui pourraient être donné en association avec les antibiotiques déjà existants afin de restaurer leur activité.

Pour cela nous avons utilisé en parallèle deux approches différentes. Nous avons utilisé d'une part une approche originale de criblage par résonance magnétique nucléaire. Plusieurs expériences RMN à une ou deux dimensions permettent de détecter la fixation d'une petite molécule sur une cible macromoléculaire en observant soit le signal de la cible soit celui du ligand. L'observation des modifications du signal de la macromolécule, induites par la fixation de ligand, permet de déterminer la zone de fixation sur la macromolécule si l'attribution des spectres de celle-ci est connue. Nous avons choisi ici d'observer le signal des ligands puisque nous ne disposons pas de cette attribution. L'observation du ligand permet, de plus, de n'utiliser qu'une très faible quantité de macromolécule. Les expériences RMN utilisées pour observer le signal du ligand sont des expériences à une dimension, rapides, ne nécessitant pas de marquage isotopique et qui permettent d'identifier les parties du ligand qui sont en contact direct avec la cible. Ces techniques permettent également d'identifier des ligands de faible affinité qui échapperaient aux méthodes traditionnelles. Ceci permet d'envisager le criblage de molécules de complexité modeste afin d'identifier des déterminants élémentaires de liaison. Ces pharmacophores simples peuvent ensuite être combinés ou enrichis afin d'augmenter leur affinité. Nous disposons au laboratoire d'un dispositif robotisé d'injection des échantillons dans une sonde à flux continu permettant de cribler plusieurs dizaines de molécules par jour. Nous avons utilisé les expériences de transfert de saturation (STD) et de pompage NOE (NOE pumping). Notre stratégie dans la recherche de composés ligands de l'enzyme repose donc sur une construction par fragment. Un premier fragment, mime du cycle central des aminoglycosides, a été conçu en collaboration avec Laurent Micouin du Laboratoire de Chimie Thérapeutique, et a été utilisé comme chassis moléculaire central dans notre conception d'inhibiteurs. Ce composé a été conçu pour conserver les motifs structuraux, identifiés pour les aminoglycosides, essentiels à

la fixation de ces antibiotiques sur leurs cibles (ARN bactérien et enzyme de résistance), tout en étant de synthèse simple. Une série de molécules, dérivées de ce chassis, a donc été synthétisée par nos collaborateurs et criblée sur l'enzyme de résistance par les techniques de RMN. Nous avons ainsi pu identifier les motifs structuraux possédant la meilleure affinité pour l'enzyme. En parallèle nous avons également testé l'activité antibiotique de ces molécules mimes d'aminoglycosides afin d'identifier éventuellement un composé présentant une activité antibiotique mais n'ayant aucune affinité pour l'enzyme.

D'autre part, nous avons utilisé une approche plus classique de biologie structurale. Disposer de la structure d'une macromolécule permet de guider la conception rationnelle de ligand de cette molécule. En effet, la structure de complexe protéine-ligand à résolution atomique permet d'identifier précisément les d'interactions impliquées dans la reconnaissance du ligand. Deux techniques principales permettent de résoudre la structure de macromolécules biologiques à la résolution atomique : la RMN et la cristallographie aux rayons X. L'AAC(6')-Ib a une masse d'environ 22 kDa ce qui rend la résolution de sa structure par RMN relativement longue. Pour la cristallographie aux rayons X, l'étape la plus limitante est l'obtention de cristaux. Dans notre cas, nous avons réussi à obtenir rapidement des pistes de cristallisation à partir de kits commerciaux. Nous avons alors choisi la cristallographie aux rayons X pour tenter de résoudre la structure tridimensionnelle de l'enzyme. L'objectif était d'obtenir les structures des trois enzymes complexées avec leur antibiotiques déterminant le phénotype de résistance, ainsi que les structures de complexes enzyme-inhibiteur. Nous avons pu résoudre les structures de l'enzyme sauvage complexée au CoA et à la kanamycine ainsi que la structure du mutant AAC(6')-Ib₁₁. Pour le mutant AAC(6')-Ib-cr, nous n'avons pas obtenu de cristaux exploitables pour la diffraction aux rayons X ce qui nous a conduit à proposer un modèle de cette structure basé sur celle de l'enzyme sauvage. Ces structures nous ont permis d'apporter une explication structurales des différents phénotypes de résistance observés pour les trois formes de l'enzyme. Nous avons également pu identifier de nouveaux motifs structuraux se fixant sur l'enzyme laissant envisager la conception de nouveaux ligands.

Dans une première partie, j'exposerai les études préliminaires de stabilité et d'activité des trois formes de l'AAC(6')-Ib. Puis, dans une deuxième partie, la stratégie de conception du mime du cycle central des aminoglycosides sera présentée ainsi que les différents résultats de la recherche d'inhibiteurs de l'enzyme conçus à partir de ce mime. Dans une troisième partie, les résultats de recherche d'activité antibactérienne de ces molécules seront présentés. Enfin la quatrième partie exposera les études structurales des différents mutants et de leurs complexes.

Chapitre II : Résultats

I. Etudes préliminaires

A) Clonage, expression, mutagénèse

Le gène codant pour l'AAC(6')-Ib₁₁ de *Salmonella enterica* nous a été fourni par Ekkehard Collatz (Laboratoire de Recherche Moléculaire sur les Antibiotiques INSERM-Paris6). Il était inséré dans un plasmide pTYB1 permettant son expression sous forme d'une fusion N-terminale avec une intéine et un domaine de liaison à la chitine. La purification de l'enzyme se faisait alors par colonne d'affinité (système IMPACT "Intéine Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag" voir protocole en annexe 3) suivie d'une coupure autocatalytique de l'intéine en présence d'un thiol. Plusieurs problèmes se sont alors posés. D'une part l'enzyme était très peu soluble et se retrouvait en grande partie sous forme de corps d'inclusion malgré une induction de l'expression à 16°C. Les quantités surproduites étaient assez faibles. D'autre part, le rendement de purification était faible, une partie de l'enzyme restant accrochée sur la colonne. La faible solubilité de l'enzyme posait également des problèmes de précipitation lors de sa concentration en vue des études par RMN ou par cristallographie. Nous avons alors cloné le gène dans le plasmide pET101, sans étiquette, à l'aide du système d'expression pET101/D-Topo (Invitrogen) (annexe 2). Les clones recombinants ont d'abord été isolés sur milieu contenant de l'ampicilline puis ont été soumis à un test de sélection phénotypique sur milieu contenant un aminoglycoside (LB-kanamycine 30 µg/mL), à 37°C, en l'absence d'induction. Dans ces conditions, le niveau d'expression résiduel de l'AAC(6') à partir du promoteur *lac* est faible et la plupart des clones présentaient un phénotype de croissance très ralentie, probablement lié à l'instabilité/insolubilité de l'enzyme. Certains clones montraient cependant une croissance normale et nous avons sélectionné l'un d'eux qui s'est avéré permettre la surexpression de l'enzyme sous forme soluble. Après séquençage, nous avons remarqué que le variant sélectionné présentait une délétion d'un nucléotide dans le codon stop, impliquant un décalage (*read-through*) du cadre de lecture de sept codons. L'enzyme résultante présente donc l'extension C-terminale hydrophile suivante : EGRAQFE. Le reste de la séquence des 196 acides aminés n'étant pas modifié et cette extension améliorant la solubilité, nous avons conservé ce variant pour nos études.

Le gène de l'enzyme AAC(6')-Ib (Q106, L107) sauvage ainsi que le gène du mutant AAC(6')-Ib-cr (R92, Y169) (séquences figure 21 de l'introduction) ont été obtenus par mutagénèse dirigée à l'aide du système QuickChange (Stratagene). Après vérification des mutations par séquençage, les deux enzymes ont été surproduites dans les mêmes conditions que l'AAC(6')-Ib₁₁ (matériels et méthodes, I).

B) Oligomérisation

Les trois protéines ont été analysées par filtration sur gel afin d'analyser leur état d'oligomérisation. L'enzyme sauvage ainsi que l'AAC(6')-Ib-cr ont un volume d'élution correspondant à un monomère en solution. Le variant AAC(6')-Ib₁₁ présente un profil indiquant un équilibre monomère-dimère avec le dimère en excès (figure 23). Les deux mutations du variant -Ib₁₁ induisent donc un changement de l'état d'oligomérisation de la protéine en favorisant l'apparition d'un dimère. Les tests d'activité *in vitro* de l'enzyme (matériels et méthode) ont montré que les deux formes, monomère ou dimère, étaient actives en solution.

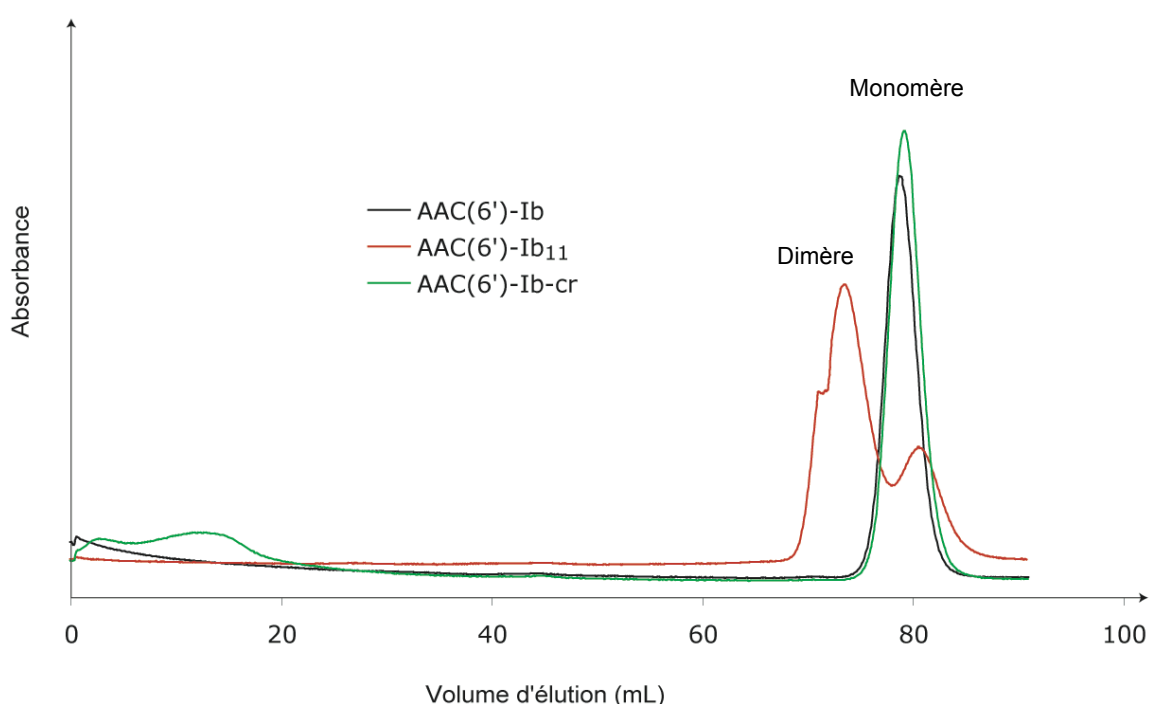


Figure 23 : Profils d'élution des trois enzymes sur gel filtration (superdex 200)

C) Spectre d'activité

L'activité de la protéine *in vitro* est contrôlée après chaque purification par un test d'acétylation (matériels et méthodes, II).

Pour l'activité *in vivo*, les concentrations minimum inhibitrices (CMI) des antibiotiques indiquant la spécificité de profil de substrat des différents mutants de l'enzyme ont été mesurées. Ces CMI ont été mesurées en milieu LB liquide (matériels et méthodes, III) avec les différentes souches d'*E. coli* BL21 portant les plasmides de résistance aux aminoglycosides codant pour les trois AAC(6')-Ib. Ces CMI indiquent bien le profil de

substrat attendu. En particulier, la CMI de la gentamicine est quatre fois plus élevée pour la souche exprimant l'enzyme mutante Ib₁₁ que pour la souche exprimant l'enzyme sauvage (tableau 6). Le variant Ib-cr confère bien une résistance à la ciprofloxacine (CMI deux fois plus élevée que pour les autres variants) avec une perte de la résistance aux aminoglycosides (tableau 6).

| Antibiotique Enzyme | Amikacine (µg/mL) | Gentamicine (µg/mL) | Ciprofloxacine (µg/mL) |
|--------------------------|----------------------|------------------------|---------------------------|
| AAC(6')-Ib sauvage | 20 | 10 | 0.002 |
| AAC(6')-Ib ₁₁ | 40 | 40 | 0.002 |
| AAC(6')-Ib-cr | < 20 | 5 | 0.004 |

Tableau 6 : Valeurs des CMI des antibiotiques en fonctions des différents variants de l'AAC(6')-Ib

D) Production de l'enzyme marquée ¹⁵N

Le marquage isotopique à l'azote 15 a été réalisé tout d'abord avec la première forme peu soluble de l'enzyme AAC(6')-Ib₁₁ (matériels et méthodes, IV). Ce marquage permet d'observer par RMN la région des protons amides de la protéine en enregistrant des spectres à deux dimensions (HSQC ou TROSY ¹H - ¹⁵N). Ces spectres sont nécessaires pour l'obtention d'empreintes de fixation des ligands. Le spectre TROSY obtenu présente beaucoup de superpositions de pics rendant délicate l'interprétation des spectres (figure 24). Aux concentrations utilisées en RMN, la protéine a de plus tendance à s'agréger et à précipiter au cours du temps, rendant l'échantillon instable. Ce marquage a alors été effectué à nouveau avec la construction de l'enzyme possédant l'extension C-terminale améliorant la solubilité. Nous avons pu produire et purifier une quantité suffisante d'enzyme, à une concentration de 12 mg/mL (0,5 mM), et obtenir un spectre TROSY de meilleure qualité (figure 24) permettant d'observer les variations de déplacement chimique induite par l'ajout de ligand.

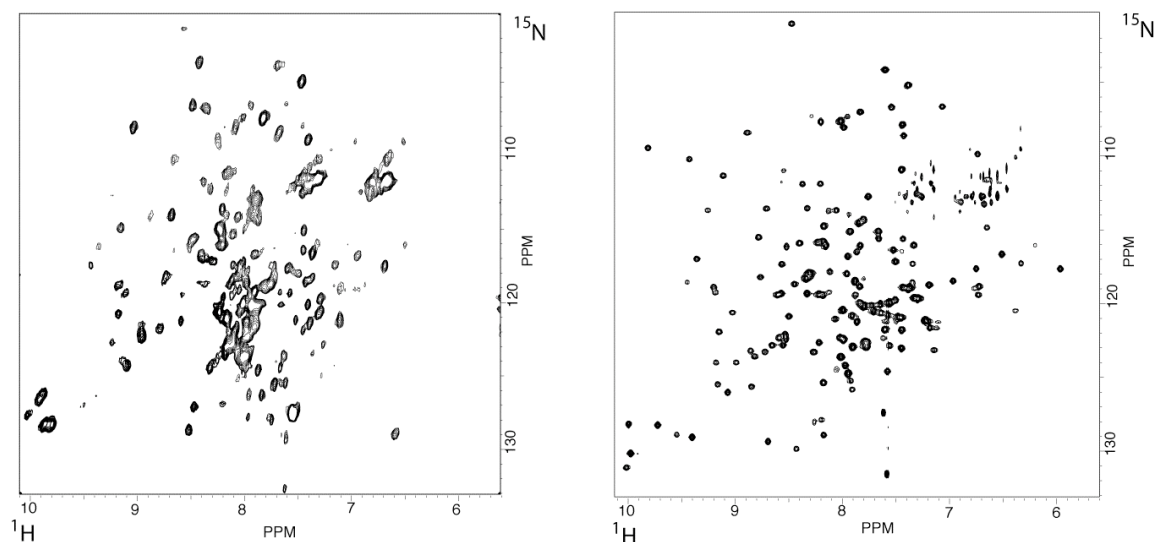


Figure 24 : Spectres TROSY de la protéine AAC(6')-Ib₁₁. A gauche : spectre de l'enzyme produite sans l'extension C-terminale (0,3 mM). A droite : spectre de l'enzyme avec l'extension améliorant la solubilité (0,5 mM). Le massif au centre du spectre de gauche est caractéristique des signaux de protéine partiellement dénaturée.

II. Conception d'inhibiteurs

A) Le diaminocyclopentanol (DACP) comme mime de la désoxystreptamine

Notre stratégie pour la conception d'inhibiteurs de l'activité enzymatique se base sur la découverte d'un mime du cycle central des aminoglycosides. Le but est d'obtenir un mime conservant une affinité pour les deux cibles des aminoglycosides que sont le site A de l'ARN 16S et les enzymes de modification, mais qui soit synthétisable plus facilement que la désoxystreptamine et ses dérivés. Ce mime constituerait alors un motif central de départ dans la conception d'inhibiteur de résistance enzymatique ou de nouveaux antibiotiques qui présenterait l'avantage d'être synthétisable facilement en grande quantité.

J'ai étudié par RMN, pendant mon DEA, la fixation de la kanamycine sur l'AAC(6')-Ib₁₁. Nous avons tout d'abord réalisé l'attribution spectrale de la kanamycine. Pour cela, des spectres à deux dimensions [¹H-¹³C]-HSQC, COSY, ROESY et à trois dimensions [¹H-¹³C]-TOCSY-HSQC en abondance naturelle ¹³C ont été enregistrés. Le spectre à une dimension ainsi que le spectre HSQC sont représentés sur la figure 25 avec l'attribution de la kanamycine. L'utilisation de la dimension ¹³C a été nécessaire pour résoudre les résonances de la région des protons glycosidiques, particulièrement dense en signaux.

Nous avons pu montrer ensuite, par des méthodes de transfert de saturation (STD, principe paragraphe B2), que la fixation de la kanamycine se faisait principalement par le cycle central désoxystreptamine (DOS), et plus particulièrement par le motif de fixation 1,3 *cis*-diamine (figure 26). Les études structurales des complexes aminoglycosides-ARN ont également montré que ce motif 1,3 diamine était fortement impliqué dans la reconnaissance des aminoglycosides par le site A (Ogle *et al.* 2001 ; Vicens et Westhof 2001). Un mime de la désoxystreptamine fixant les deux cibles (ARN et enzyme de résistance) doit donc conserver ce motif. La rigidité structurale du cycle DOS apparaît également comme étant nécessaire à la reconnaissance par l'ARN et donc à l'activité antibiotique (Hermann et Westhof 1998 ; Tor *et al.* 1998 ; Hermann et Westhof 1999). Nous avons donc choisi comme mime de la DOS, le diaminocyclopentanol (DACP). En effet, cette molécule cyclique conserve le motif 1,3 *cis*-diamine mais s'obtient beaucoup plus facilement que la DOS, en peu d'étapes de synthèse (figure 26). De plus, cette molécule n'étant pas symétrique (contrairement à la DOS), sa fonctionnalisation sélective est possible simplement. La stratégie de synthèse de cette molécule et de ses dérivés a été mise au point par l'équipe de Laurent Micouin (Perez Luna *et al.* 2002).

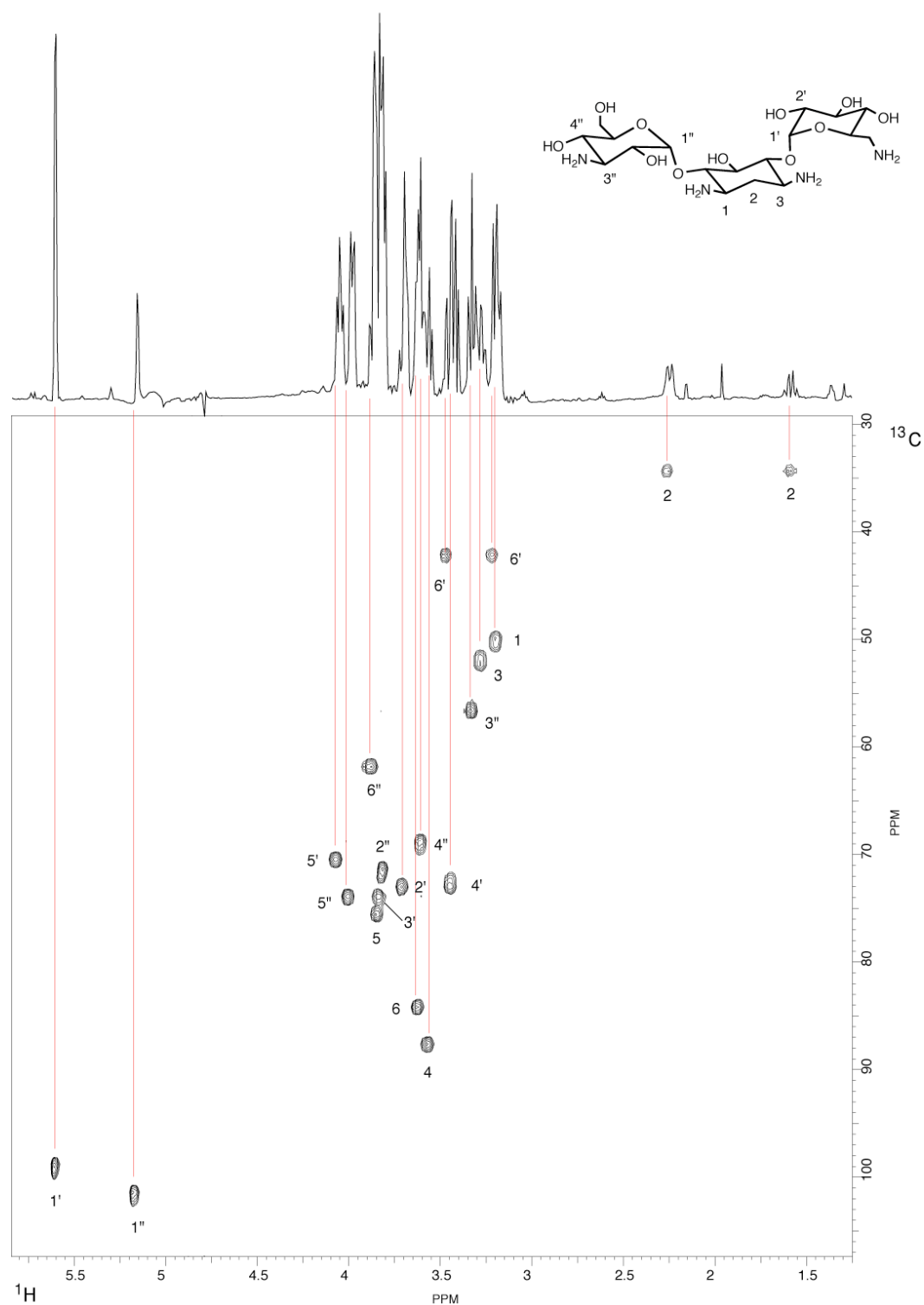


Figure 25 : Attribution RMN de la kanamycine. En haut : Spectre 1D de la kanamycine (40 mM dans 20 mM phosphate de potassium pH 7.5). En bas : spectre 2D $[\text{}^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ HSQC du même échantillon.

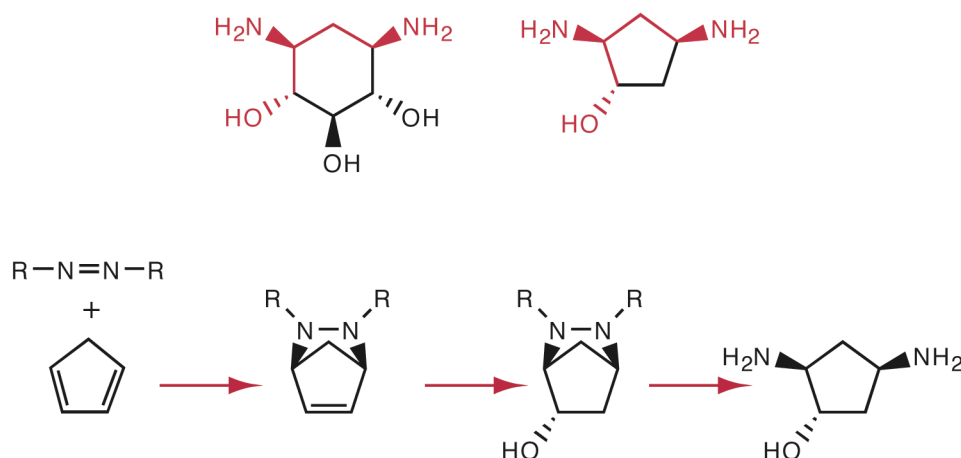


Figure 26 : En haut : comparaison des structures de la DOS (à gauche) et du diaminocyclopentanol (DACP) (à droite). Le motif conservé est représenté en rouge. En bas : schéma simplifié de la synthèse du DACP (Perez Luna et al. 2002)

B) Validation du mimétisme structural

1) Sur le site A de l'ARN 16S d'*E. coli*

Pour tester la fixation du DACP sur le site A de l'ARN 16S d'*E. coli*, nous avons suivi les variations des déplacements chimiques des protons imino de l'ARN en fonction de l'ajout de quantités croissantes de DACP. Les protons imino des bases G et U, situés au centre des appariements Watson-Crick, s'échangent très rapidement avec l'eau. Ils ne sont observables que si la paire de base est formée. Leur déplacement chimique très décalé (aux alentours de 13 ppm) permet de les observer en RMN à une dimension. L'ARN utilisé est un ARN tige boucle synthétique mimant le site A de l'ARN 16S. Cet ARN a été synthétisé à façon chez Dharmacon puis déprotégé et dialysé au laboratoire. Lorsqu'on titre l'ARN par le DACP, on observe des variations des déplacements chimiques des protons iminos ainsi qu'un élargissement de ces pics, indiquant une fixation du DACP sur l'ARN. La figure 27 montre ces effets pour un rapport ARN:DACP de 1 pour 4. Les variations de déplacement chimique sont plus importantes pour les bases U1490, G1405, G1494, G1491. Cette même empreinte de fixation a été observée pour la désoxystreptamine sur le site A (Fourmy *et al.* 1996). Le DACP et la DOS se fixent donc dans la même région du site A de l'ARN. Le DACP constitue donc bien un analogue structural valide de la DOS.

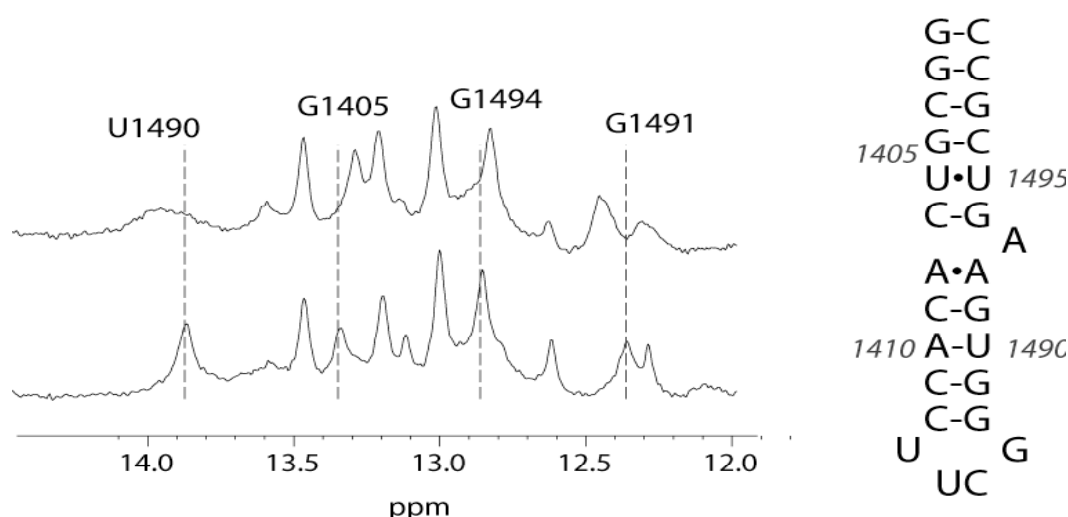


Figure 27 : Variations des déplacements chimiques des protons iminos du site A de l'ARN 16S. En bas spectre de l'ARN seul (0,5mM), en haut : spectre de l'ARN mélangé avec 4 équivalents de DACP (2mM). A droite : structure de l'oligoribonucléotide synthétique utilisé mimant le site A, la numérotation correspond à celle de l'ARN 16S entier.

2) Sur l'enzyme de résistance à large spectre : l'AAC(6')-Ib₁₁

Le mutant AAC(6')-Ib₁₁ est la forme de l'enzyme que nous avons étudié en premier lieu au laboratoire, ce variant possédant le profil de substrat le plus large. Les études de fixation du DACP et le criblage pour la recherche d'inhibiteurs ont donc été réalisés avec cette forme de l'AAC(6')-Ib dans la mesure où elle constitue la menace la plus importante en terme de profil de résistance.

Pour tester la fixation du DACP sur l'enzyme par RMN, nous avons utilisé une technique de transfert de saturation : la méthode de différence de transfert de saturation ou STD ("Saturation transfer difference") (Mayer et Meyer 2001). Cette technique utilise la différence de deux spectres. Le spectre STD lui-même est enregistré en saturant des résonances cibles ; une première expérience est effectuée en saturant une bande de fréquence de la protéine où il n'y a pas de signal du ligand (le plus souvent correspondant à la région des méthyles). Une seconde expérience témoin, où l'on irradie "hors-résonance", c'est-à-dire loin de tous les signaux de la protéine ou du ligand, est également enregistrée. L'irradiation pendant plusieurs secondes des méthyles de la protéine conduit à une saturation de toute la protéine par diffusion de spin. La saturation est transférée aux parties liées du ligand par transfert de saturation intermoléculaire (figure 28). Dans le spectre "hors -résonance", les intensités de tous les signaux n'ont pas changé contrairement au spectre STD où les intensités des protons liés ont diminué. Les signaux de la protéine sont supprimés par un

filtre $T_{1\rho}$ et seul le ligand est observé (le filtre $T_{1\rho}$ utilise la différence de vitesse de relaxation du signal RMN, rapide pour les macromolécules et lente pour les petits ligands).

La soustraction du spectre irradié et du spectre "hors-résonance" donne un spectre où l'on ne voit que les signaux des protons du ligand en contact avec la protéine. Le degré de saturation des résonances du ligand dépend de la distance entre les protons impliqués et la protéine. Les protons du ligand les plus proches et les plus fortement liés à la macromolécule seront beaucoup plus saturés, et conduiront donc à un signal STD plus fort. La soustraction peut être faite de différentes manières. L'approche la plus simple consiste à soustraire manuellement les spectres après acquisition de chaque spectre séparément, mais cette approche présente des risques. En effet, des petites variations de la température de l'échantillon ou de l'homogénéité du champ magnétique peuvent conduire à des artefacts lors de la soustraction. Il est préférable que la soustraction soit faite par un cyclage de phase, seul le spectre de différence est enregistré (Zerbe 2003).

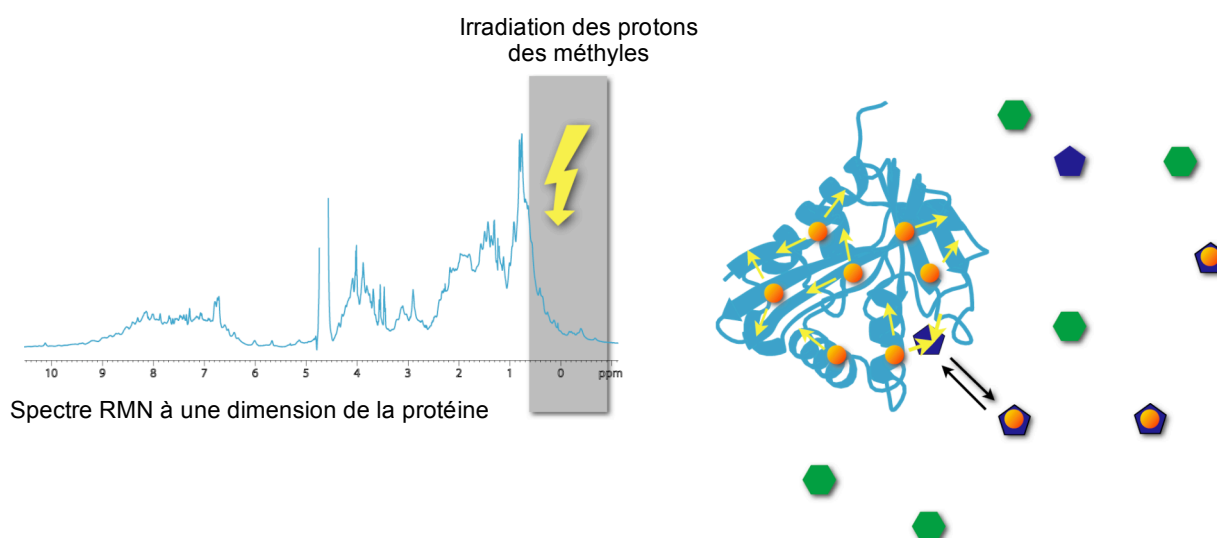


Figure 28 : Principe du STD. L'irradiation des protons des méthyles de la protéine se propage aux molécules qui se fixent sur l'enzyme (représentées en bleu foncé) et se transmettent par échange au ligand libre.

La figure 29 présente la comparaison des spectres STD obtenus pour la kanamycine et le DACP. Sur le spectre STD de la kanamycine (en bas), les intensités des pics des protons du cycle central (en position 2) représentés en rouge sur la structure de la kanamycine sont fortement augmentées par rapport au spectre référence. Ces deux protons sont donc les plus proches ou les plus fortement liés à la protéine. Le proton en position axiale (proton situé du même côté du plan du cycle que les deux amines, grisé sur la structure et le

spectre) a le signal STD le plus intense et est donc le plus en contact avec la protéine. Ces deux protons sont encadrés par des fonctions amines qui peuvent également interagir avec la protéine par des liaisons hydrogènes ou ioniques. La fixation de la kanamycine s'effectue donc principalement par le cycle DOS, par la face contenant les deux amines. Sur le spectre STD du DACP (en haut), on observe le même motif de fixation. Les deux protons entre les deux amines ont le signal STD le plus intense, particulièrement pour le proton axial (grisé sur la structure et le spectre). D'autre part, l'ajout de kanamycine dans l'échantillon contenant le mélange protéine-DACP provoque une diminution des signaux STD du DACP indiquant une fixation compétitive au même site.

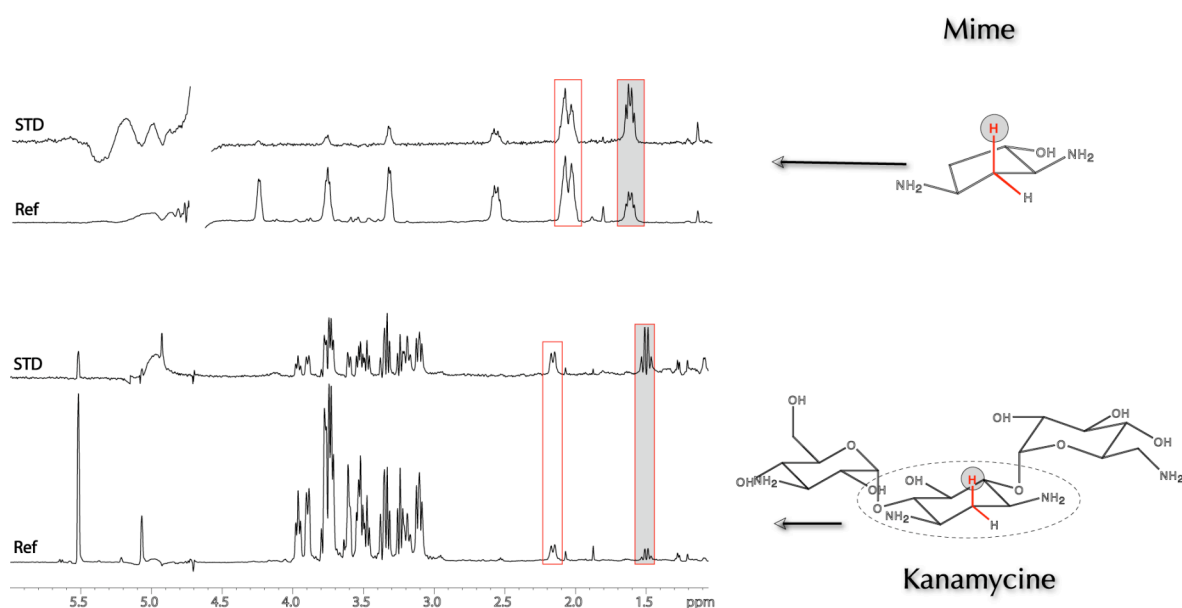


Figure 29 : Comparaison des spectres STD du DACP (en haut) et de la kanamycine (en bas). Les pics des deux protons les plus proches de l'enzyme sont encadrés en rouge sur les spectres et tracés en rouge sur les structures, le proton axial, le plus proche, est grisé. Le cycle DOS de la kanamycine est entouré en pointillés.

3) Conclusion

Nous avons donc validé l'utilisation du DACP comme mime de la désoxystreptamine sur l'enzyme de résistance AAC(6')-Ib₁₁ et sur le site A de l'ARN 16S bactérien, cible des aminoglycosides. Les aminoglycosides fixant d'autres ARN, la fixation du DACP a également été validée au laboratoire par Carine Tisné sur l'ARN_t^{Lys3}, amorce de la transcription du VIH-1 (Chung *et al.* 2007). Cette molécule peut donc être utilisée comme châssis moléculaire central dans la conception d'inhibiteurs de résistance ou de nouveaux antibiotiques, mimes des aminoglycosides ou plus généralement dans la conception de nouveaux ligands d'ARN. Un brevet a été déposé pour cette molécule (Bonin *et al.* 2004).

C) Conception des inhibiteurs : construction par fragment

A partir de ce mème, notre stratégie de conception d'inhibiteurs repose sur une construction par fragments. Le principe est de synthétiser une série de molécules en ajoutant un premier fragment sur le DACP, puis de cribler cette première série de molécules et de sélectionner les meilleurs candidats. Un deuxième fragment est ajouté à ces meilleurs candidats constituant ainsi une deuxième série de molécules à cribler. Les meilleurs candidats sont sélectionnés pour l'ajout d'un troisième fragment, et ainsi de suite jusqu'à obtention d'un ligand de haute affinité.

Les aminoglycosides étant constitués de la DOS reliée à des cycles de type glucosamine, nous avons ajouté sur le DACP des molécules cycliques. Ces cycles sont le plus souvent aromatiques mais quelques sucres ont également été testés. Deux types de connexion entre le DACP et ce deuxième cycle ont été testés : la liaison éther (comme c'est le cas pour les aminoglycosides) et la liaison ester. Plusieurs groupes fonctionnels portés par le deuxième cycle ont été testés, des groupements amines mais aussi des groupements nitro (NO₂) ou nitrile (CN) (voie de synthèse en annexe 5). Un bilan représentant toutes les structures des molécules synthétisées ainsi que les résultats du criblage et des mesures d'affinité est présenté en annexe 4. Aucun composé à trois fragments n'a été synthétisé pour l'instant.

D) Etude des inhibiteurs

1) Criblage sur l'enzyme

a) Méthodes

Pour sélectionner les molécules se fixant sur l'enzyme, nous avons utilisé un criblage par RMN. Cette technique présente l'avantage de permettre la détection des interactions faibles mais éventuellement spécifiques. Nous avons ainsi pu cribler par cette méthode des molécules relativement simples, et donc d'affinité peu élevée. De plus, le spectromètre RMN du laboratoire est équipé d'une sonde à flux continu reliée à un robot de pipettage. Cet équipement offre un avantage évident de gain de temps et de main d'œuvre permettant de cribler plusieurs dizaines de molécules par jour.

Nous avons utilisé les techniques de STD (décrite précédemment), de pompage NOE (nuclear Overhauser effect) ou *NOE pumping* (Chen et Shapiro 1998), et de pompage NOE inverse (*reverse NOE pumping*) (Chen et Shapiro 2000). Ces techniques permettent de détecter des interactions entre des molécules de faible poids moléculaire et une protéine cible (avec des constantes de dissociation allant du molaire au micromolaire) en observant le

signal du ligand. Le *NOE pumping* repose sur le transfert d'aimantation de la protéine vers le ligand, par couplage dipôle-dipôle. L'intensité de ce transfert est reliée à la distance entre les atomes du ligand et ceux de la protéine dans le complexe. Un filtre de diffusion est effectué avant l'expérience NOE pour éliminer sélectivement l'aimantation des protons du ligand. Le ligand, beaucoup plus petit que la protéine cible, diffuse en effet beaucoup plus vite dans l'échantillon. En utilisant une technique dite « écho de gradient de champ magnétique », on peut ainsi défocaliser les signaux des petites molécules qui se sont déplacées par diffusion, ce qui annule leur aimantation macroscopique, sans toucher à ceux de la protéine. Le ligand peut alors récupérer de l'aimantation, principalement par contact avec la protéine, via le couplage dipolaire NOE intermoléculaire.

Les signaux détectés à la fin de l'expérience proviennent donc de ce transfert NOE de la protéine vers le ligand. Les pics observés sur le spectre *NOE pumping* correspondent donc aux protons les plus proches de la protéine. Nous avons utilisé plus particulièrement le *reverse NOE pumping*. Cette technique, plus sensible, repose sur le transfert NOE du ligand vers la protéine. Un filtre de relaxation (filtre $T_{1\rho}$ comme pour le STD) est effectué pour atténuer le signal de la protéine sans affecter le signal du ligand. Pour détecter uniquement le *NOE pumping* et soustraire l'effet de relaxation, un spectre référence est enregistré. La différence des deux spectres indique donc les protons les plus proches de la protéine.

b) Résultats

La figure 30 montre les spectres *reverse NOE pumping* (RNP) obtenus pour une série de molécules bi-cycliques. La partie droite des spectres correspond aux signaux des protons du DACP, qui est un cycle saturé et dont les résonances se situent entre 1 et 4 ppm. Dans les exemples montrés, le deuxième fragment est un cycle aromatique, dont les signaux sont eux situés entre 5 et 8 ppm. Ces spectres permettent donc de visualiser de manière individuelle la liaison de chacune des deux parties du ligand, en analysant les deux cotés du spectre.

Toutes les expériences sont enregistrées dans des conditions identiques de concentration et d'amplification du signal. Les intensités observées sont donc le reflet quantitatif des transferts NOE entre le ligand et la protéine. L'analyse détaillée des spectres nous a permis de classer les ligands en trois catégories. La première catégorie de spectres (en haut et non encadrés sur la figure) ne présentent pas de pics dans la région des aromatiques (de 5 à 9 ppm) indiquant une absence de fixation du deuxième fragment, et présentent des pics d'intensité très faible dans la région des protons du DACP (de 1 à 4 ppm) indiquant une diminution de la fixation, par rapport au DACP seul. La deuxième catégorie de molécules (spectres encadrés en bleu ciel) présente un spectre RNP indiquant une conservation de la fixation du fragment DACP mais l'absence de pics dans la région des aromatiques indique une mauvaise fixation du deuxième fragment. Enfin la dernière catégorie de molécules

(spectres encadrés en bleu foncé) présente des pics intenses dans la région des protons du DACP et des aromatiques indiquant une bonne fixation des deux fragments de ces molécules.

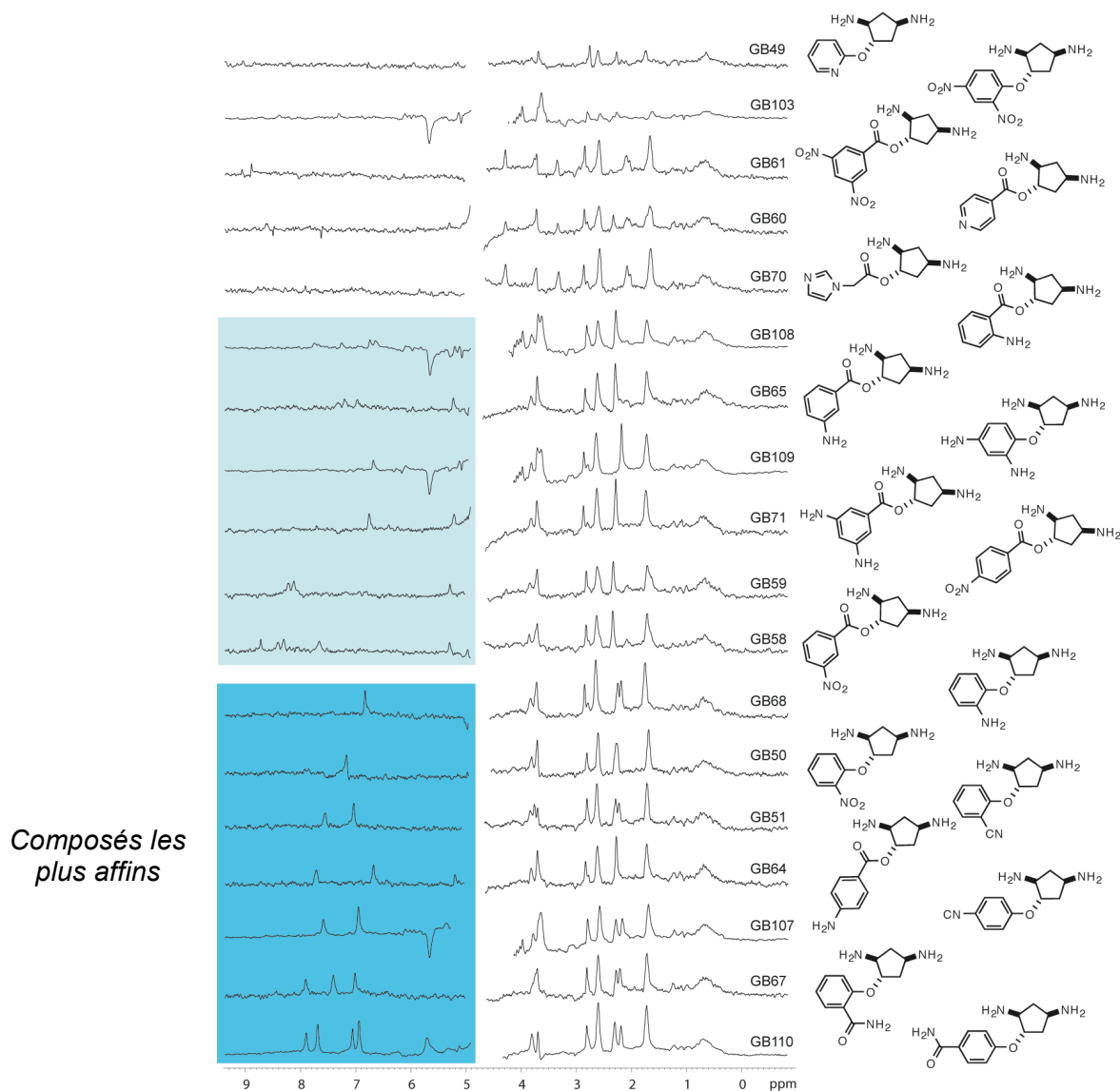


Figure 30 : Criblage par RMN d'une première série de molécules. Les spectres RNP sont classés du haut vers le bas en fonction de l'affinité. Le signal de l'eau (4.7 ppm), très intense, a été supprimé dans un souci de clarification des spectres.

2) Mesure des constantes de dissociation par spectroscopie de fluorescence

Les constantes de dissociation (K_d) des molécules pour l'enzyme ont pu être mesurées par spectroscopie de fluorescence. Le site actif de l'enzyme contenant trois tryptophanes, la variation de l'intensité de fluorescence intrinsèque de ces tryptophanes induite par l'ajout de ligand permet de mesurer une constante de dissociation. Nous avons pu alors confirmer que la RMN donnait une information qualitative sur l'affinité relative des ligands. En effet les

valeurs de K_d mesurées étaient en accord avec les spectres RMN, c'est-à-dire que les composés possédant le meilleur K_d avaient un spectre STD ou RNP montrant un fort transfert d'aimantation entre la protéine et le ligand (pics nombreux et intenses). Par exemple, le composé 2 sur la figure 31 possède un meilleur K_d que le composé 3 et son spectre RNP appartient à la catégorie colorée en bleu foncé sur la figure 32. Le spectre RNP du composé 3 présente peu de pics et est classé parmi les mauvais ligands (colorée en bleu ciel) pour la partie aromatique. Son K_d est moins bon que celui du DACP. De nombreux autres composés n'ont malheureusement pas pu être testés par cette approche, car ils possèdent une fluorescence intrinsèque significative, dans des longueurs d'onde analogues à celle du tryptophane, ce qui vient masquer le signal de la protéine. En particulier la plupart des composés comportant une liaison éther sont fluorescents en raison de la présence d'un groupement phénolique.

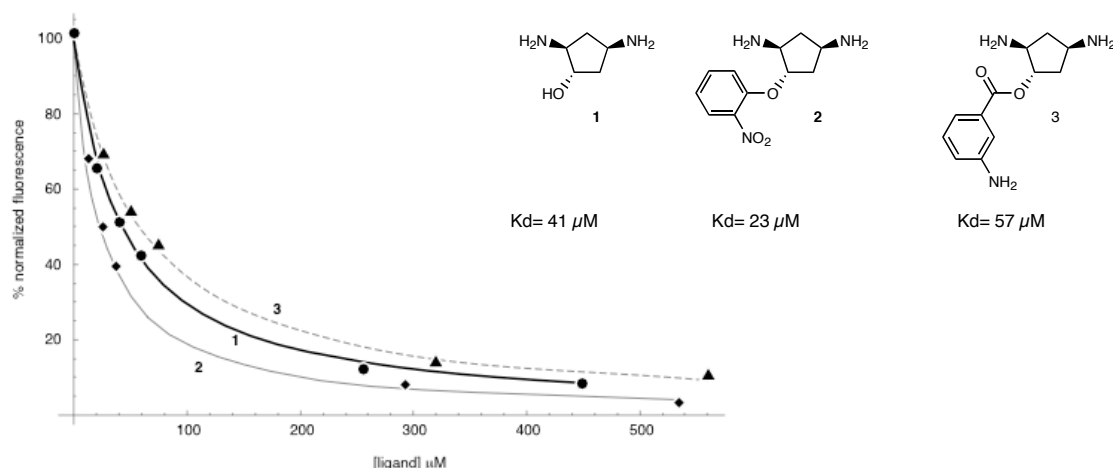


Figure 31 : Titration par fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 345 \text{ nm}$) des molécules 1 (DACP), 2 (GB50) et 3 (GB65) sur l'enzyme de résistance AAC(6')-Ib₁₁.

3) Empreintes RMN

La forme soluble de l'enzyme présentait un spectre RMN de bonne qualité qui laissait envisager la faisabilité d'une étude structurale par cette technique. Néanmoins, à ce stade du travail, des pistes prometteuses de cristallisation ayant été obtenues (voir paragraphe IV de ce chapitre), nous avons décidé stratégiquement de ne pas poursuivre l'attribution RMN qui s'annonçait difficile pour une enzyme de 43 kD (2x196 résidus). Néanmoins, l'approche RMN permet de suivre directement l'effet de la fixation d'un ligand sur la protéine, même en l'absence d'attribution du spectre.

Nous avons donc déterminé les empreintes RMN (spectres à deux dimensions TROSY) de la kanamycine et de l'un des composés, sur l'enzyme marquée à l'azote 15. Le composé sélectionné, le GB67, était l'un des meilleurs d'après les expériences de RNP (figure 30). Les empreintes induites par la kanamycine et par ce produit sur l'enzyme concernent les mêmes pics. La figure 32 montre la superposition des trois spectres TROSY de l'enzyme seule et complexée avec la kanamycine ou le GB67. Des exemples de déplacements similaires de pics sont encadrés en bleu sur cette figure. La kanamycine, possédant une meilleure affinité (0,1 μ M), induit des variations de déplacements chimiques plus importantes, voire des disparitions de pics. L'attribution des pics n'ayant pas été réalisée, ces empreintes ne permettent pas de définir le site de fixation sur l'enzyme mais la similitude des résonances affectées indique que les composés "GB" dérivés du DACP se fixent au même site que les aminoglycosides.

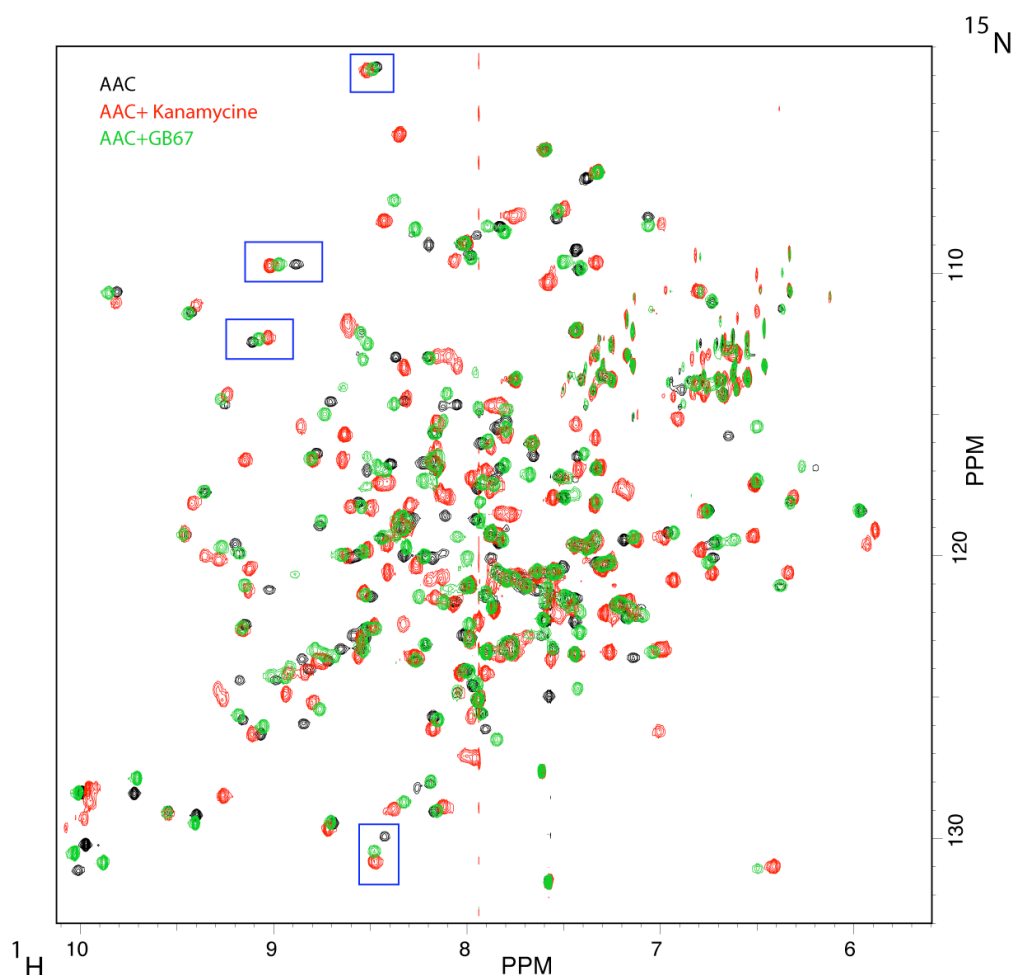


Figure 32 : Spectres TROSY superposés de l'enzyme AAC(6')-Ib₁₁ marquée à l'azote 15 (0,5 mM) seule (noir), en présence de 1mM kanamycine (rouge) ou de 1mM GB67 (vert)

4) Tests d'inhibition

L'activité inhibitrice de la résistance des molécules peut être testée *in vivo* sur les souches d'*E. coli* transformées avec le plasmide de l'AAC(6')-Ib₁₁. Des antibiogrammes comparés de l'antibiotique seul ou mélangé avec les composés présentant la meilleure affinité ont été réalisés (matériels et méthodes, VI). Malheureusement, aucune restitution de l'efficacité de l'antibiotique n'a pu être observée avec ces molécules bi-cycliques. Nous avons alors testé l'activité des molécules *in vitro* avec le test d'activité au DTNB, mais l'absence d'activité inhibitrice significative des molécules bi-cycliques *in vivo* a été confirmée par ces expériences. Cependant, le test d'activité au DTNB présente un bruit de fond élevé et une sensibilité limitée qui rend très difficile la détection de l'activité d'un inhibiteur dont le K_i serait deux ordres de grandeur plus élevé que le K_d du substrat, soit environ 10 μ M. Il faudrait donc gagner un facteur 10 sur l'activité de nos molécules pour pouvoir observer un effet par ce test. De plus, certains composés sont substrats de l'enzyme et sont donc acétylés ce qui ne permet pas la mesure d'une constante d'inhibition par ce test.

5) Bilan

Nous avons constaté tout d'abord que la liaison entre les deux fragments la plus favorable à la fixation était la liaison éther, mode de liaison des cycles des aminoglycosides existants. De plus, nous avons également constaté que les hétérocycles étaient défavorables à la fixation de nos molécules sur l'enzyme. Les structures des molécules possédant les meilleures affinités sont encadrées dans la figure 33. Les groupements fonctionnels nitriles, amines ($\text{Ar-CH}_2\text{-NH}_2$) ou amides sur le cycle aromatique ont donné les meilleurs résultats. On peut remarquer que ces différents composés ont tous un azote en position β du cycle aromatique (Ar-C-N), de manière analogue à la position 6' de la glucosamine, cycle prime des aminoglycosides (figure 34). Ceci suggère, dans l'hypothèse d'une conformation similaire de ces molécules, que cet atome d'azote pourrait se positionner dans le site actif à proximité du site d'acétylation. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'on peut observer une faible activité d'acétylation par l'enzyme sur les composés portant une amine primaire en β du cycle (GB 167 et 169, structures en annexe 4).

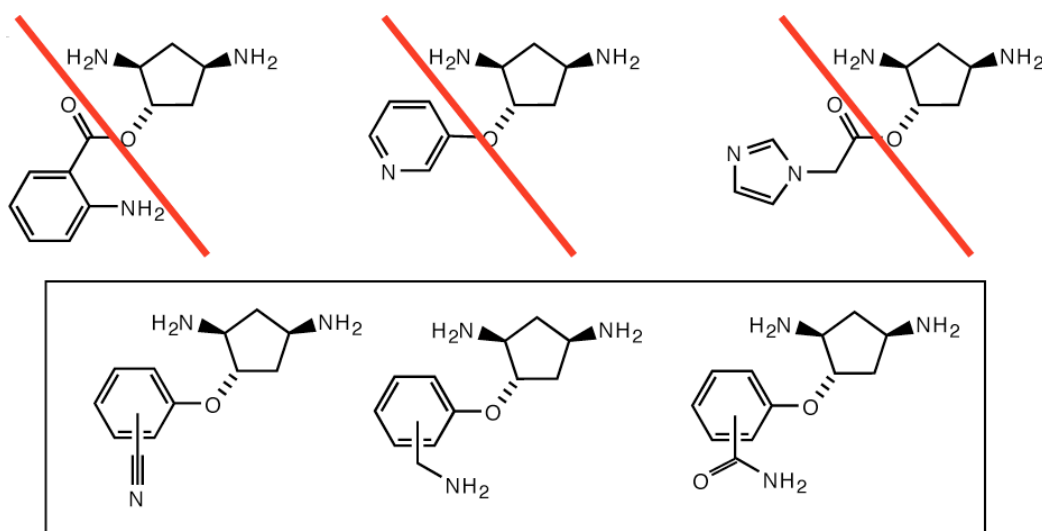


Figure 33 : Bilan du criblage des composés bi-cycliques sur l'enzyme de résistance AAC(6')-Ib₁₁. Les composés du panneau supérieur sont inactifs et ceux du panneau inférieur correspondent aux meilleurs ligands.

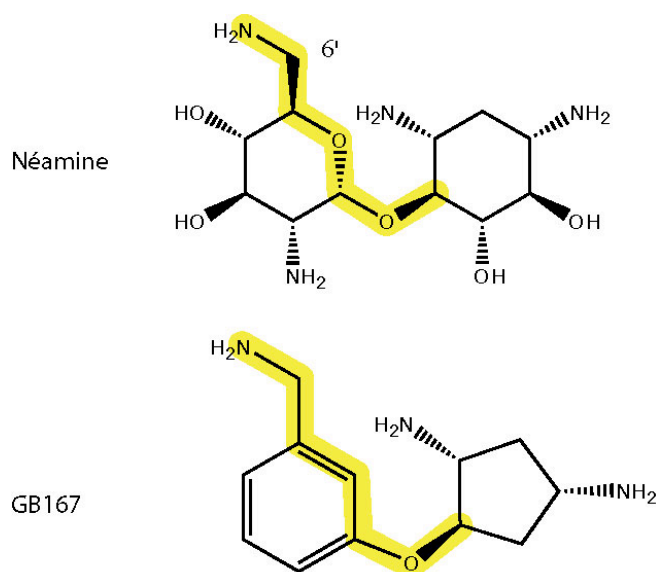


Figure 34 : Comparaison structurale plane de la néamine avec le GB167. On peut remarquer la similitude entre l'amine en β du cycle aromatique du GB167 et l'amine en position 6' de la néamine, toutes deux acétylées par l'enzyme.

La molécule bi-cyclique présentant la meilleure constante de dissociation mesurée par spectroscopie de fluorescence est le composé GB 211 (annexe 4) avec un K_d de 4 μ M. Le deuxième fragment de cette molécule est un sucre possédant une amine primaire, également acétylable par l'enzyme ce qui n'a pas permis de mesurer l'inhibition de l'acétylation des aminoglycosides par le test au DTNB. Cependant, ces molécules possèdent

des K_d pour l'enzyme encore trop faibles pour pouvoir inhiber fortement l'activité enzymatique en se fixant à la place de l'antibiotique. L'objectif serait d'obtenir un composé d'une affinité proche ou supérieure à celle des aminoglycosides. Le K_d de la kanamycine, l'un des meilleurs substrats de l'enzyme, étant de 0,1 μM , l'ordre de grandeur de l'affinité nécessaire pour obtenir un inhibiteur efficace serait de la centaine à la dizaine de nanomolaire. A ce stade, trois stratégies sont envisageables pour augmenter l'affinité : soit ajouter des fonctions permettant d'augmenter les interactions avec l'enzyme, soit rigidifier la structure pour diminuer la perte d'entropie lors de la liaison du ligand, soit ajouter un nouveau fragment formant des interactions additionnelles. Dans ce contexte, le fait de disposer d'une structure de l'enzyme, éventuellement en complexe avec ces premiers composés, est un avantage déterminant, car il permet de guider la stratégie de développement des premiers ligands obtenus.

La première partie de l'étude d'identification des composés ligands de l'enzyme AAC(6')-Ib₁₁ par les méthodes de RMN (STD, NOE pumping) a donné lieu à une publication intitulée "NMR identification of ligands of aminoglycoside resistance enzymes", parue en 2006 dans CR Chimie, présentée à la fin de ce manuscrit.

E) Inhibiteur « bi-substrat »

Nous avons également construit un composé "bi-substrat" combinant les composés bi-cycliques et le coenzyme A (figure 35). Nous avons utilisé, pour la partie bi-cyclique, le GB169 car il présente un spectre RMN RNP indiquant une fixation sur l'enzyme. Son K_d pour l'enzyme est d'environ 25 μM et cette molécule est substrat de l'enzyme. Cette stratégie de construction d'inhibiteurs "bi-substrats" a déjà été utilisée avec des aminoglycosides, constituant l'une des deux parties de l'inhibiteur, et le CoA, constituant la deuxième partie (Williams et Northrop 1979 ; Gao *et al.* 2005; Gao *et al.* 2006).

La constante de dissociation de cette molécule sur l'AAC(6')-Ib₁₁ a été évaluée à 1 μM par spectroscopie de fluorescence. Son activité a ensuite été testée *in vivo* par antibiogramme mais aucune activité significative n'a été détectée. Cependant, ce composé bi-substrat présente une faible activité inhibitrice *in vitro* (test au DTNB) qui nous a permis d'estimer une constante d'inhibition de l'ordre de la dizaine de micromolaire. L'absence d'activité *in vivo* de ce composé est probablement due à son caractère fortement polaire, qui risque de limiter sévèrement sa pénétration dans les cellules. La constante d'inhibition mesurée reste assez faible comparée aux résultats obtenus avec les autres inhibiteurs bi-substrats (aminoglycosides-CoA) testés sur d'autres enzymes (Williams et Northrop 1979)

(Gao *et al.* 2005; Gao *et al.* 2006). L'affinité du composé GB169 ($K_d = 25\mu\text{M}$), utilisé comme premier fragment de l'inhibiteur, est certainement encore insuffisante. La distance entre la partie mime d'aminoglycoside et le CoA doit également être optimisée pour améliorer l'affinité et l'inhibition de ce composé bi-substrat.

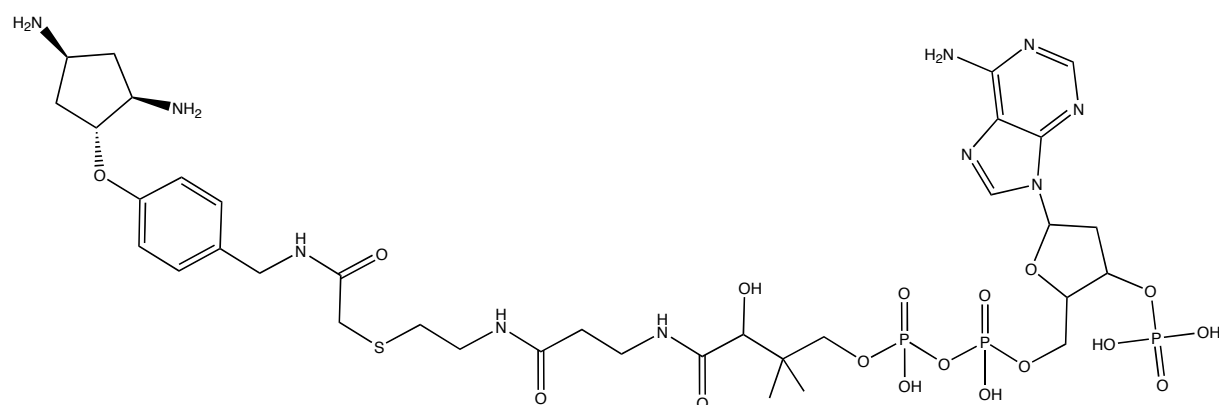


Figure 35 : Structure de l'inhibiteur bisubstrat (TOM20)

III. Recherche d'activité antibiotique

A) Le GB109, composé antibiotique

En parallèle du criblage par RMN sur l'enzyme de résistance permettant d'isoler des composé substrats ou inhibiteurs, nous avons également testé directement l'activité antibiotique des molécules mimes d'aminoglycosides. L'objectif était de réaliser un criblage différentiel, c'est-à-dire d'isoler soit des inhibiteurs de l'activité enzymatique (ligands de l'enzyme) soit des molécules antibiotiques ayant une faible affinité pour l'enzyme de résistance. L'activité antibiotique est testée par antibiogramme (matériels et méthodes, VI) sur des souches d' *Escherichia coli* JM101Tr. Parmi toutes les molécules testées, une seule présentait une activité antibiotique, le GB109 (figure 36). Nous avons pu mesurer une concentration minimum inhibitrice (CMI) en milieu Luria-Bertani solide (matériels et méthodes, III) sur ces souches d'*E. coli* ainsi que sur les même souches dans lesquelles nous avons inséré le plasmide de résistance aux aminoglycosides codant pour l'AAC(6')-Ib₁₁. Cette activité antibiotique a été comparée avec celle de la néamine, cet aminoglycoside à deux cycles étant le plus proche d'un point de vue structural de notre molécule. La CMI du GB109 est de 120 µg/mL, celle de la néamine de 10 µg/mL, le GB109 présente donc une activité antibiotique mais de moindre efficacité que les aminoglycosides existants (tableau 7).

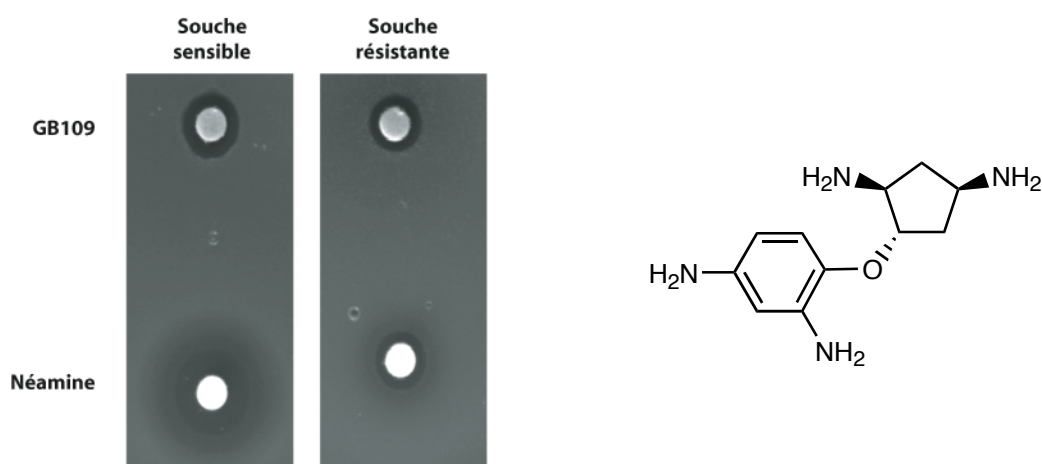


Figure 36 : A gauche : antibiogrammes du GB109 et de la néamine sur les souches d'*E. coli* sensibles et résistantes aux aminoglycosides. A droite : structure du GB109

D'autre part, la fixation de cette molécule sur l'enzyme de résistance AAC(6')-Ib₁₁ a été testée par STD (figure 37). Le spectre présente très peu de pics du côté des résonances de la partie DACP et aucun pic dans la région des protons aromatiques. Ceci indique une

mauvaise fixation du GB109 sur cette enzyme. Ceci a été confirmé par la mesure de CMI sur les souches résistantes aux aminoglycosides par production de l'AAC(6')-Ib₁₁. En effet, cette valeur de CMI est très proche de celle mesurée sur les souches sensibles, le GB109 n'est donc pas ou peu affecté par l'enzyme de résistance contrairement à la néamine (tableau 7). Nous avons également testé par RMN la fixation du GB109 sur le site A de l'ARN 16S d'*E. coli*. Des spectres à deux dimensions NOESY ont été réalisés avec l'ARN seul ou en présence de GB109 (figure 38). Des pics de corrélations intermoléculaires ont pu être observés, particulièrement entre la partie DACP du GB109 et la paire de base U1406-U1495. Ces corrélations intermoléculaires indiquent une fixation du GB109 sur le site A de l'ARN 16S.

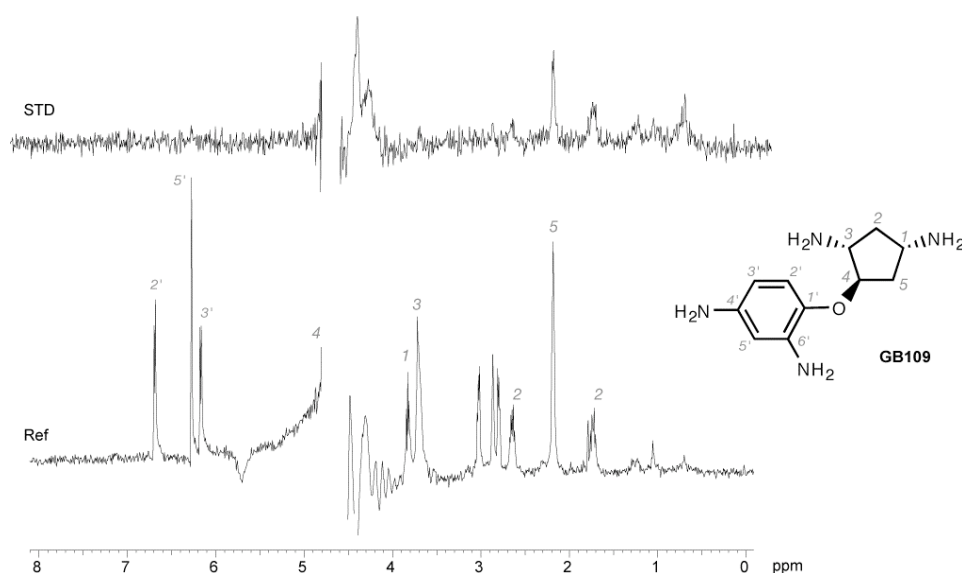


Figure 37 : Le GB109 ne se lie pas sur l'enzyme de résistance. En bas : spectre référence du GB109 1mM, l'attribution est notée au sommet des pics en fonction de la numérotation du GB109 (à droite). En haut : spectre STD du mélange GB109 (1mM), AAC(6')-Ib₁₁ (50 µM).

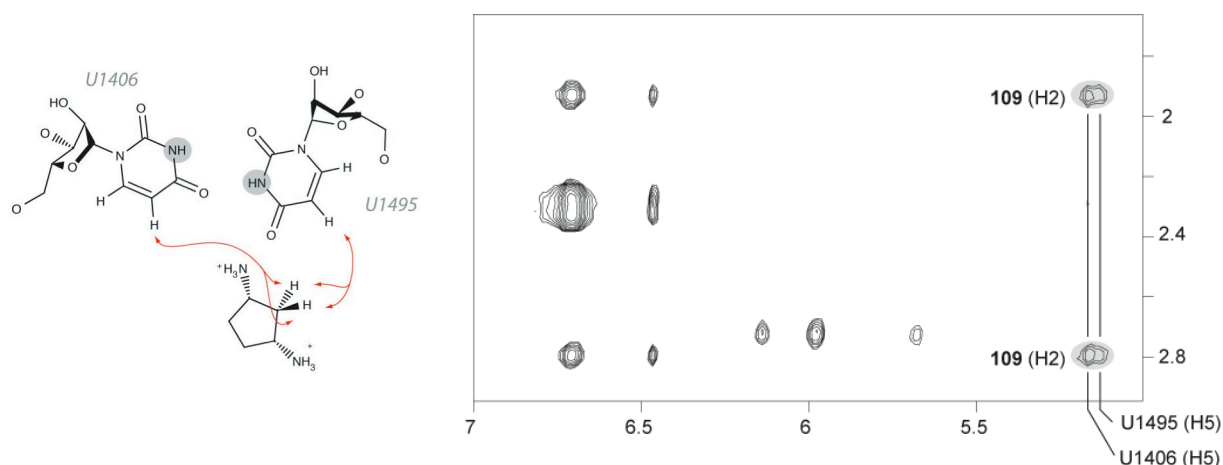


Figure 38 : Corrélations intermoléculaires entre le site A de l'ARN 16S et le GB109. A gauche : Représentation schématique des interactions entre la partie DACP du GB109 et la paire de base U1406 :U1495 basée sur les NOE observés. A droite : Spectre RMN NOESY, les corrélations intermoléculaires sont grisées.

Nous avons par la suite vérifié que cette activité antibiotique était bien corrélée à une inhibition de la synthèse des protéines comme c'est le cas pour les aminoglycosides. Nous avons testé cette propriété *in vitro* avec un kit de transcription-traduction couplée (EasyXpress Protein Synthesis Mini Kit, Qiagen) (matériels et méthodes, VII). Dans ce test, on détecte la synthèse d'une protéine à partir d'un ADN matrice par un système acellulaire reconstitué contenant tous les facteurs cellulaires nécessaires : ARN polymérase, facteurs de traduction, ARNt, ribosomes ... L'ajout d'antibiotiques ciblant le ribosome, bloque la synthèse de la protéine codée par l'ADN introduit dans le système. Nous avons ainsi suivi sur gel SDS-PAGE le taux de production de la protéine EF-Ts, protéine codée par l'ADN contrôle fourni dans le kit, en fonction de l'ajout de quantités croissantes de GB109 ou de néamine. L'ajout de GB109 provoque bien une diminution de la quantité de protéine traduite (figure 39). Nous avons préalablement vérifié que le produit n'était pas contaminé par une activité RNase, par incubation dans les mêmes conditions avec un ARN peu structuré connu, ce qui exclut que l'effet observé résulte d'un effet indirect sur la stabilité de l'ARNm dans le test et suggère qu'il s'agit d'un effet direct. Les concentrations inhibitrices de 50% de l'activité (CI_{50}) déduites de ce kit sont du même ordre de grandeur pour le GB109 et la néamine, environ 25 μ M et 20 μ M respectivement (tableau 7).

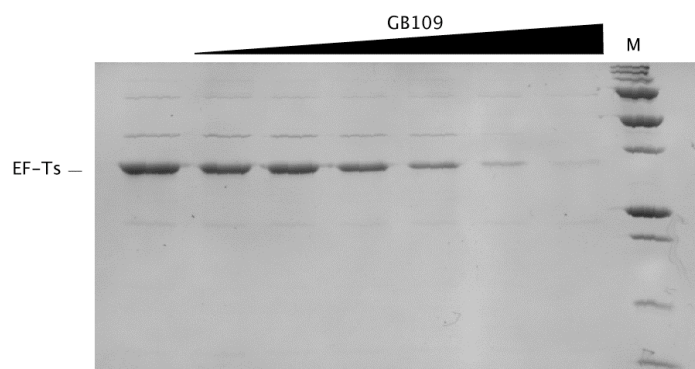


Figure 39 : Analyse par électrophorèse de la protéine EF-Ts, produite par le kit de transcription traduction couplée, sur gel SDS-PAGE, en fonction de la quantité de GB109 ajoutée. M : marqueurs de poids moléculaire.

| Composés | K_d (μM) | CI_{50} (μM) | CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | |
|----------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| | | | <i>E. coli</i> sensible | <i>E. coli</i> résistant |
| Néamine | 12 | 20 | 25 | 130 |
| GB109 | 3,6 | 25 | 165 | 180 |

Tableau 7 : Valeurs comparées des constantes de dissociation pour l'ARN 16S (K_d) et des valeurs de CI_{50} et de CMI pour le GB109 et la néamine

Ce composé étant fortement fluorescent ($\lambda_{\text{exc}} = 384 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 478 \text{ nm}$), nous avons pu mesurer une constante de dissociation sur le site A de l'ARN 16S. En effet, l'ajout d'ARN provoque une diminution de l'intensité de fluorescence du GB109 (figure 42) de l'ordre de 60%. Le GB109 se fixe fortement sur le site A avec un K_d de $3,6 \mu\text{M}$ ($12 \mu\text{M}$ pour la néamine). De plus, l'ajout de kanamycine en fin d'expérience restaure la fluorescence initiale du GB109, indiquant une fixation compétitive.

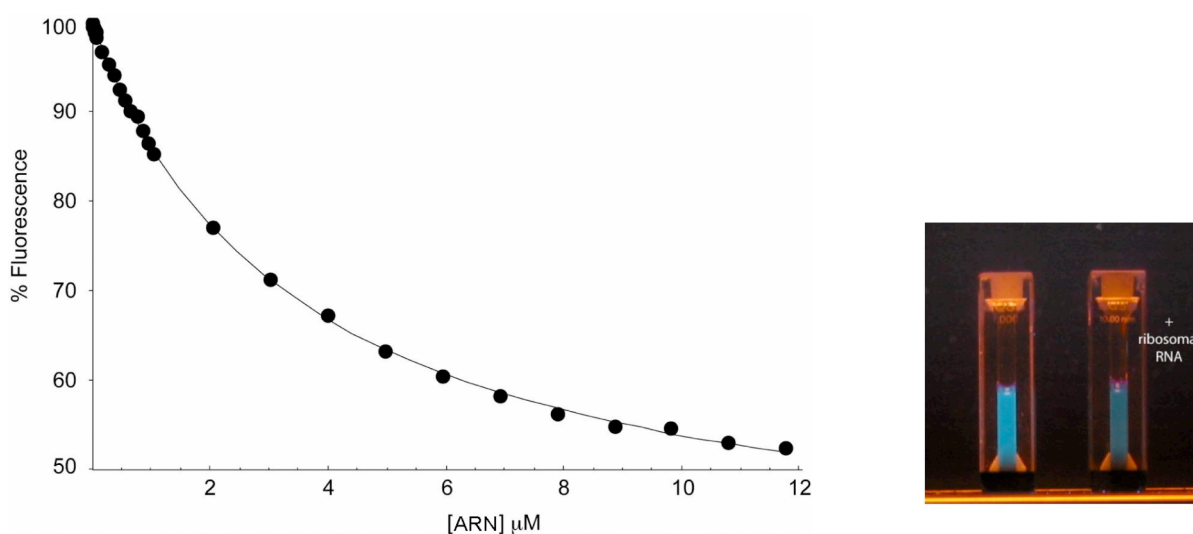


Figure 40 : Fluorescence du GB109. A gauche : titration du site A de l'ARN 16S sur le composé fluorescent GB109. A droite : photos de cuves contenant le GB109 seul ou le GB109 et l'ARN (site A de l'ARN 16S) éclairées par une lumière UV, l'ajout d'ARN diminue l'intensité de fluorescence.

B) Identification du produit actif

Malheureusement, cette molécule s'est avérée très instable en solution. Le spectre RMN réalisé après les expériences précédemment décrites montre la présence de plusieurs produits d'oxydation (figure 41). De nouvelles synthèses ont été réalisées mais le produit s'oxyde très rapidement au cours de la dernière étape de synthèse en prenant une coloration brune. Nous n'avons donc pas réussi à déterminer la structure de la molécule active dans ce mélange complexe. Cependant, nous avons pu observer des NOE entre la partie DACP et l'ARN, ce qui confirme qu'il existe bien une liaison spécifique stable au site A du ribosome. Nous pouvons supposer que le produit actif soit le produit fluorescent puisque c'est lui qui se

fixe sur l'ARN avec une bonne affinité et que l'activité antibiotique est probablement due à cette interaction avec l'ARN. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que le produit actif fluorescent contiendrait notre mime de DOS, le DACP.

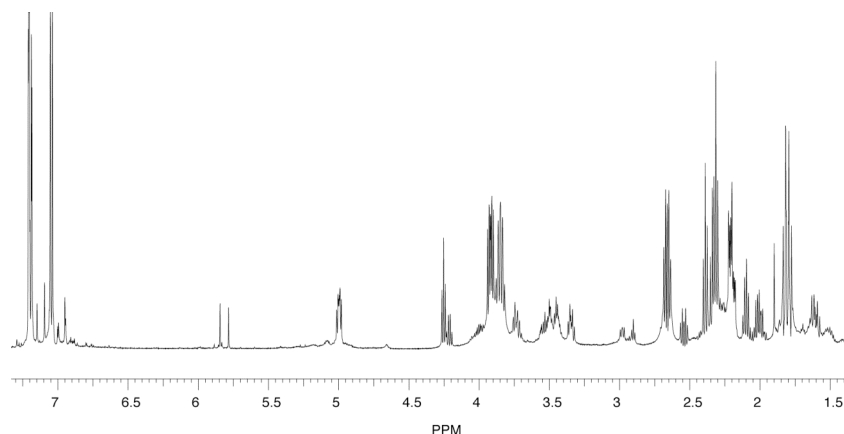


Figure 41 : Spectre RMN du mélange de composés d'oxydation du GB109

C) Conclusion et perspectives

Nous avons donc un composé, qui contiendrait le DACP, présentant une activité antibiotique y compris sur les souches produisant l'enzyme de résistance à spectre étendu l'AAC(6')-Ib₁₁. Ce composé a une bonne affinité pour le site A ce qui pourrait permettre un criblage de nouveaux ligands du site A, son signal de fluorescence étant sensible à la liaison à l'ARN, il peut être utilisé pour révéler la fixation d'un produit très affiné dans un test de compétition. Malheureusement, l'instabilité du produit ne nous a pas permis de caractériser sa structure exacte. Les études devront être poursuivies afin de déterminer la nature des produits composant le mélange et d'identifier parmi eux le produit actif. Cette caractérisation permettrait de vérifier notre hypothèse d'une corrélation entre l'effet antibiotique, la fluorescence et la fixation sur l'ARN. Dans ce cas, d'autres dérivés du DACP, proches de ce produit actif, pourraient également être synthétisés afin d'améliorer l'activité antibiotique.

IV. Etudes structurales

En parallèle des études précédentes, nous avons entrepris des études structurales de l'AAC(6')-Ib et de ses variants afin de comprendre, l'adaptation de l'enzyme aux différents substrats et de guider la conception future d'inhibiteurs. Le variant AAC(6')-Ib₁₁ présente en effet la capacité d'acétyler tous les aminoglycosides contrairement à la forme sauvage dont le spectre d'activité est plus réduit. Le variant AAC(6')-Ib-cr présente lui la capacité d'acétyler les fluoroquinolones. Nous voulions donc d'obtenir les structures cristallographiques des trois mutants complexés avec leurs antibiotiques spécifiques et avec l'acétyl-CoA.

A) L'AAC(6')-Ib₁₁

1) Cristallogénèse

Les premières études structurales ont été réalisées avec le variant AAC(6')-Ib₁₁ conférant un spectre de résistance élargi à tous les aminoglycosides (regroupe les deux phénotypes de résistance de classe I et de classe II), y compris la gentamicine et l'amikacine.

Pour les essais de cristallisation, l'AAC(6')-Ib₁₁ est concentrée à 15mg/mL dans du tampon HEPES pH 7,5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. J'ai alors testé les 384 conditions de cristallisation de deux kits commerciaux (Index et Crystal Screen, Hampton) à l'aide d'un robot de cristallisation (Cybio) disponible au laboratoire. Ce robot dépose des gouttes « assises » de 0,5 µL de protéine et ajoute 0,5 µL de solution du kit contenue dans un réservoir de 100 µL. Les gouttes déposées contenaient l'enzyme seule ou l'enzyme complexée au CoA et/ou à la kanamycine. L'enzyme non complexée a cristallisé à 18°C dans une seule condition du kit Crystal Screen contenant 0,1 M de tampon HEPES à pH 7,5 et 1,5 M de sulfate de lithium mais n'a pas cristallisé en complexe avec ses substrats. Les cristaux obtenus étaient des petites plaques très fines, souvent maclées (figure 42). J'ai pu reproduire ces cristaux et effectuer des essais d'optimisation. J'ai utilisé la technique de diffusion de vapeur en gouttes suspendues en boîte Linbro (matériels et méthodes, VIII) et testé une série de conditions d'optimisation avec le kit commercial « additive screen » (Hampton). L'isopropanol s'est avéré être le meilleur additif en permettant à la fois d'augmenter la taille des cristaux et de réduire les macles. D'autres modifications ont amélioré l'aspect des cristaux comme l'ajout de glycérol combiné à une croissance à 4°C mais les cristaux résultants diffractaient à plus basse résolution.

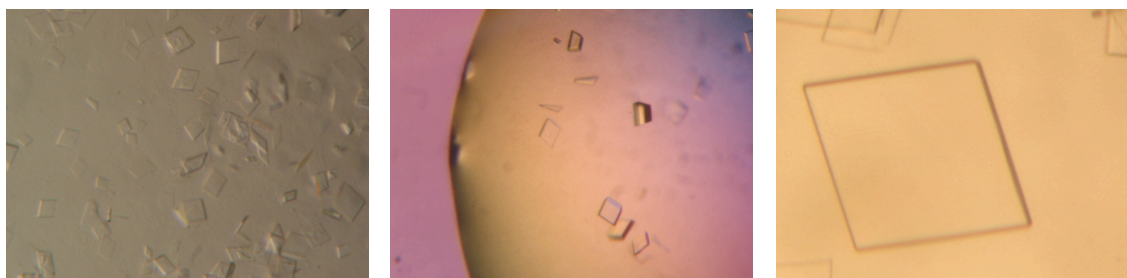


Figure 42 : Différents types de cristaux de l'AAC(6')-Ib₁₁. De gauche à droite : cristaux dans les conditions du kit (0,1 M HEPES pH7,5, 1,5 M Li₂SO₄ 18°C), optimisation avec 10% glycerol (4°C), optimisation avec 3% isopropanol (18°C)

2) Résolution de la structure

Ces cristaux nous ont permis d'enregistrer un jeu de données à l'ESRF (ligne BM30A) à une résolution de 2.1 Å. Afin de résoudre le problème des phases, des tentatives de remplacement moléculaire ont été effectuées en collaboration avec Claudine Mayer (Laboratoire de Recherche Moléculaire sur les Antibiotiques) avec les programmes Amore (Navaza 1994) et Phaser (Read 2001). Nous avons utilisé plusieurs modèles de protéines appartenant à la famille des GNAT dont les AAC(6')-Ii et Iy ou encore une acétyltransférase hypothétique (code PDB : 1yk3) présentant le plus fort pourcentage d'identité de séquence (23,4 %) avec notre enzyme. Malheureusement, ces tentatives n'ont pas donné de résultats positifs. J'ai alors produit l'enzyme sélénée sur les méthionines (matériels et méthodes, I) afin de résoudre les phases par MAD (*multiple anomalous diffusion*). La protéine contient cinq méthionines pour 196 acides aminés ce qui a suffi pour permettre la résolution des phases par MAD avec le programme SHARP. Nous avons ensuite reconstruit la protéine avec le logiciel O (Jones *et al.* 1991) et affiné cette structure à l'aide du programme CNS (Brunger *et al.* 1998) (matériels et méthodes, VIII). Les statistiques de traitement des données et d'affinement sont résumées dans le tableau 8. L'enzyme cristallise dans cette condition sous sa forme dimérique (2 monomères dans l'unité asymétrique) et dans le groupe d'espace C222₁ (figure 43). Après plusieurs cycles d'affinement, nous avons pu observer une densité électronique correspondant à une molécule d'HEPES (figure 44), tampon utilisé pour la purification et la cristallisation. Cette molécule d'HEPES se place dans le site actif de l'enzyme entre le site de fixation des aminoglycosides, chargé négativement, et le site de fixation de l'acétyl-CoA, chargé positivement (figure 45).

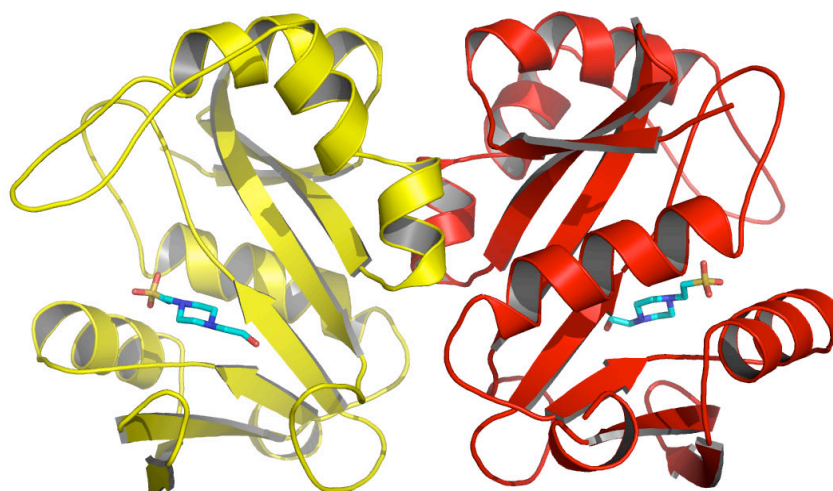


Figure 43 : Structure cristallographique de l'AAC(6')-Ib₁₁. Chaque monomère est coloré en rouge ou jaune, l'HEPES est coloré en fonction du type d'atome avec les carbones en cyan.

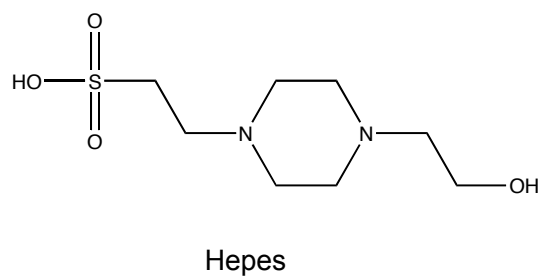
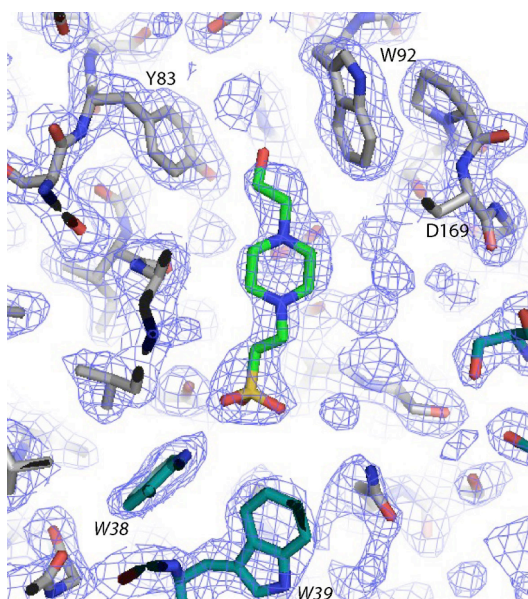


Figure 44 : Carte de densité électronique 2Fo-Fc de l'HEPES contournée à 1σ . La structure plane de l'HEPES est représentée à droite.

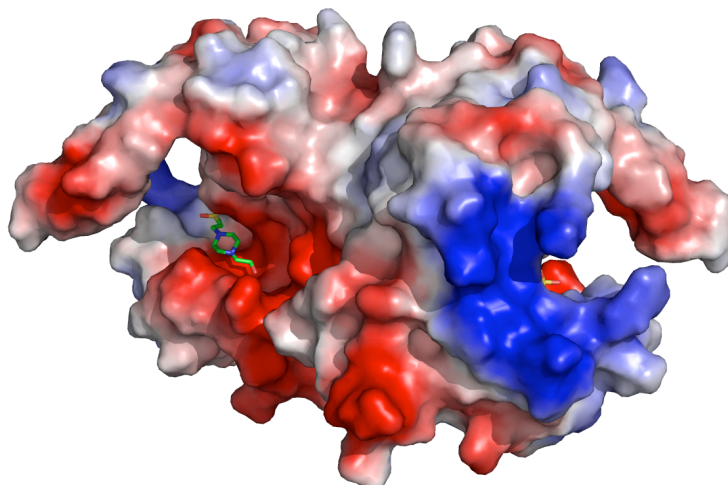


Figure 45 : Surface de l'AAC(6')-Ib₁₁ colorée en fonction du potentiel électrostatique (calculée avec PyMOL (Delano 2002)). Le rouge représente les régions chargées négativement, le bleu les régions chargées positivement. L'HEPES est coloré en fonction du type d'atome. L'axe 2 du dimère est approximativement vertical sur cette figure comme dans la figure 45.

| Traitement des données | AAC(6')-Ib ₁₁ | "Inflexion" | "Peak" | "Remote" |
|-----------------------------------|--|--------------------|--|--------------------|
| λ (Å) | 0.9340 | 0.9794 | 0.9792 | 0.9278 |
| Résolution (Å) | 2.1 | 2.8 | 2.8 | 2.8 |
| Réflexions uniques | 26597 | 22162 | 22714 | 22359 |
| Groupe d'espace | C 222 ₁ | C 222 ₁ | C 222 ₁ | C 222 ₁ |
| Paramètres de maille | a=71.6 b=85.4 c=150.4 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ | | a=72.1 b=86.6 c=151.57 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ | |
| Complétude ¹ (%) | 97.3 (94.8) | 96.9 (91.6) | 98.8 (95.3) | 97.8 (92.2) |
| Redondance ¹ | 3.7 (3.6) | 1.9 (1.9) | 3.9 (3.8) | 1.9 (1.9) |
| I/ σ ¹ | 20.6 (7.5) | 25.1 (19.3) | 29.2 (22.6) | 19.9 (13.6) |
| R _{sym} (%) ¹ | 4.5 (18.7) | 2.4 (3.3) | 3.2 (4.1) | 3.0 (5.1) |
| R _{cullis} | | 0.42 | 0.28 | 0.66 |
| Pouvoir de phasage | | 3.26 | 5.07 | 1.66 |
| Figure de mérite | | 0.83 | | |
| Affinement | AAC(6')-Ib ₁₁ | | | |
| R _{cryst} ¹ | 20.1 (17.2) | | | |
| R _{free} | 25.2 (26.0) | | | |
| Facteur B moyen (Å ²) | 30.3 | | | |
| Chaîne principale | 28.9 | | | |
| Chaînes latérales | 31.0 | | | |
| HEPES | 28.2 | | | |
| Eau | 35.5 | | | |
| Nombre d'atomes | | | | |
| Protéine | 2703 | | | |
| Hepes | 15 | | | |
| Eau | 223 | | | |
| R.m.s. | | | | |
| Longueur des liaisons (Å) | 0.016 | | | |
| Angles (°) | 1.687 | | | |

¹ Les chiffres entre parenthèses correspondent à la tranche de plus haute résolution

Tableau 8 : Statistiques cristallographiques de l'AAC(6')-Ib₁₁.

Les extrémités C-terminale (9 a. a) et N-terminale (10 a.a) n'ont pu être reconstruites. Ces extensions n'appartiennent pas au cœur de la structure : la partie C-terminale porte l'étiquette de solubilité issue de notre sélection phénotypique, et la partie N-terminale provient de la recombinaison de l'intégron.

Le repliement de la protéine confirme son appartenance à la famille des GNAT. L'enzyme est constituée d'un feuillet central de sept brins β anti-parallèles. Le feuillet central est entouré d'un côté par un "volet" (*flap*) flexible, constitué des hélices $\alpha 1$ à $\alpha 3$, se repliant sur ce feuillet, et de l'autre par les hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ (figures 46 et 47). La boucle reliant $\alpha 1$ à $\alpha 2$, appartenant à ce "volet", et plus particulièrement les acides aminés 39 à 44 de cette boucle, ont été plus difficiles à reconstruire par manque de densité électronique. Cette partie de l'enzyme présente des facteurs d'agitation thermique élevés par rapport à la moyenne de la protéine (figure 48). Les calculs de modes normaux (Lindahl *et al.*) suggèrent une grande mobilité de cette boucle très exposée au solvant pouvant expliquer l'absence de densité électronique.

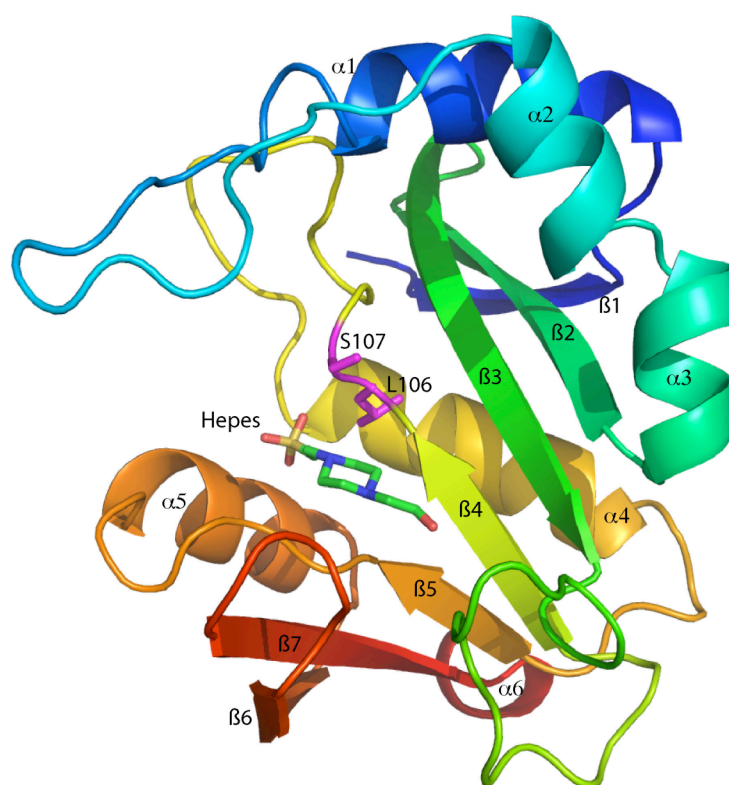


Figure 46 : Structure du monomère coloré en arc-en-ciel, les éléments de structure secondaire sont indiqués. Les deux mutations conférant le phénotype de résistance élargi, L106, S107 sont représentées en magenta.

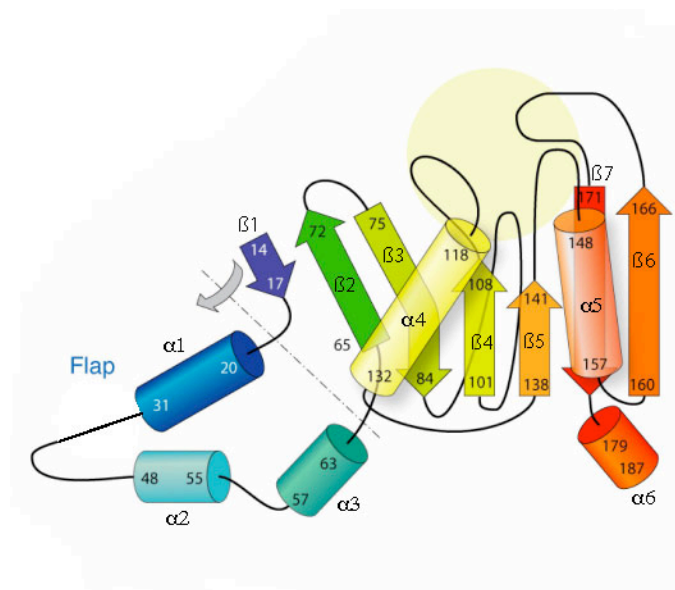


Figure 47 : Topologie de l'AAC(6')-Ib₁₁. Le code couleur est le même que dans la figure 48.

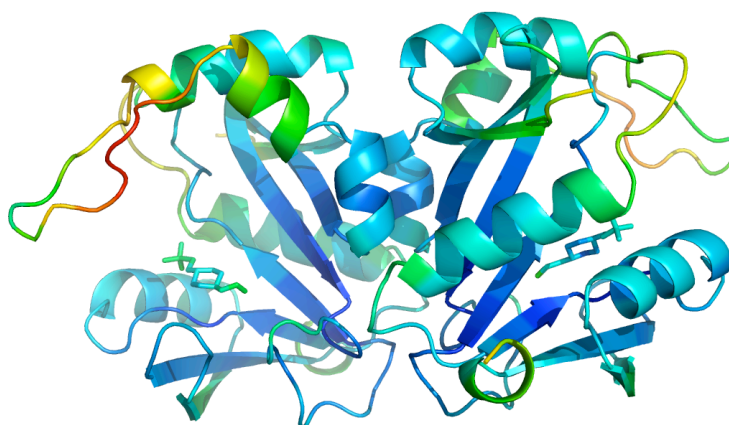


Figure 48 : Structure de l'AAC(6')-Ib₁₁ colorée en fonction des facteurs d'agitation thermique (du bleu pour les valeurs les plus faibles au rouge pour les valeurs les plus élevées).

Les tentatives de co-cristallisation ou de diffusion dans les cristaux d'aminoglycosides, de CoA ou d'acétyl CoA n'ont pas donné de résultats positifs. L'échec de la co-cristallisation est probablement dû à une compétition entre ces molécules et l'HEPES. L'HEPES contribue probablement de manière directe à la cristallisation, son remplacement par un autre tampon (Tris-HCl ou MES) à la même concentration et au même pH abolissant en effet la formation des cristaux. L'absence de diffusion de substrats dans les cristaux est probablement due à l'empilement cristallographique dans lequel le site actif est partiellement occupé à la fois par l'HEPES et par la longue boucle reliant $\alpha 1$ à $\alpha 2$ d'un autre dimère (figure 49). Nous avons

donc voulu vérifier si cette molécule d'HEPES était également capable de se fixer en solution à l'AAC(6')-Ib₁₁. Une expérience STD a été réalisée sur l'enzyme en présence d'HEPES (figure 50). L'observation de pics sur ce spectre indique l'existence d'une interaction entre l'HEPES et l'AAC(6')-Ib₁₁. Il existe donc une interaction spécifique entre l'enzyme et ce composé.

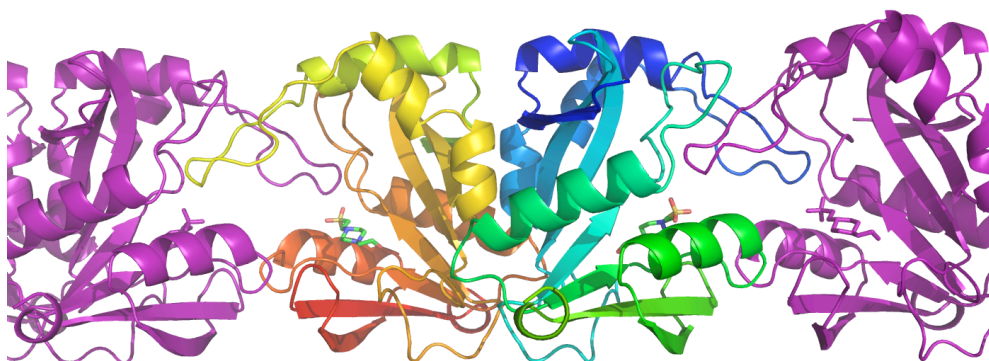


Figure 49 : Empilement cristallographique de l'AAC(6')-Ib₁₁. Le dimère correspondant au dimère biologique est coloré en arc-en-ciel, les symétriques cristallographiques sont colorées en violet. On remarque l'insertion de la boucle flexible d'un dimère (en jaune et en bleu) dans le site actif de ses voisins immédiats.

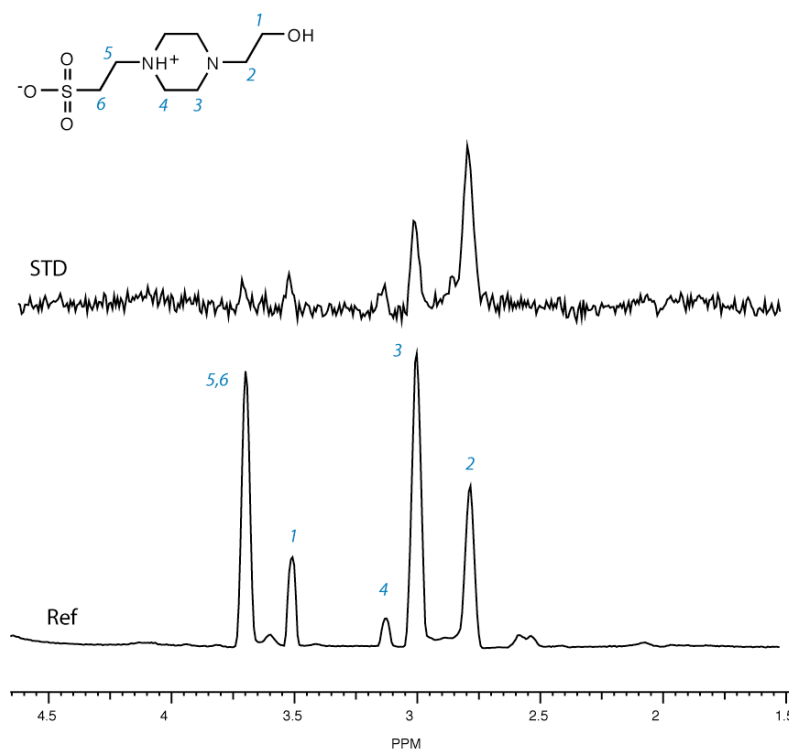


Figure 50 : Spectres STD de l'HEPES sur l'AAC(6')-Ib₁₁. La structure de l'HEPES est représentée au dessus du spectre STD. L'attribution des protons de l'HEPES est notée sur le spectre référence en bas.

B) L'AAC(6')-Ib sauvage

1) Cristallogénèse

L'enzyme sauvage purifiée dans le même tampon et à la même concentration que le mutant Ib₁₁ n'a pas donné de piste de cristallisation dans les conditions, exactes ou approchées, de cristallisation du mutant. J'ai effectué une deuxième préparation de cette enzyme en utilisant cette fois du tampon Tris HCl pH 7,5, 1mM DTT, 1mM EDTA pour éviter la présence d'HEPES dans le site actif. Nous avons criblé à 18°C les conditions de cristallisation des deux kits utilisés pour l'AAC(6')-Ib₁₁. Une condition du kit Index nous a donné une piste de cristallisation sous forme d'un amas de cristaux très fins en "oursin" (figure 51). La solution de cristallisation était composée de 1,344M K₂HPO₄ et 0,056M NaHPO₄. Les tentatives d'optimisation "classiques" (variations de la température, du pH, des concentrations en protéine et précipitants, additifs ralentissant la nucléation : glycérol, PEG ...) n'ayant pas donné de résultats, nous avons utilisé le kit d'additifs d'Hampton. Une condition a donné un cristal exploitable pour la diffraction avec l'ajout de 0,1M de guanidine. Malheureusement, ce cristal n'a jamais pu être reproduit directement. En revanche, il a été possible d'obtenir des cristaux analogues par ensemencement à partir de ce cristal initial unique. Cette technique consiste à aller toucher le cristal avec une "sonde" pour retenir une très petite partie de ce cristal et l'utiliser pour ensemercer une goutte préalablement équilibrée dans laquelle aucun cristal n'a poussé. La "sonde" est généralement fabriquée avec un poil de moustache d'animal, j'ai utilisé ici un poil de moustache de chat. Cette technique s'est avérée très efficace puisque de nombreux cristaux poussaient sur la "trace" de l'ensemencement. Il a fallu par la suite optimiser la technique afin d'obtenir des cristaux isolés. Pour cela, plusieurs gouttes sont ensemençées les unes à la suite des autres avec le même poil pour épuiser le nombre de nucleus cristallins et diminuer le nombre de cristaux reproduits dans la nouvelle goutte (figure 51).

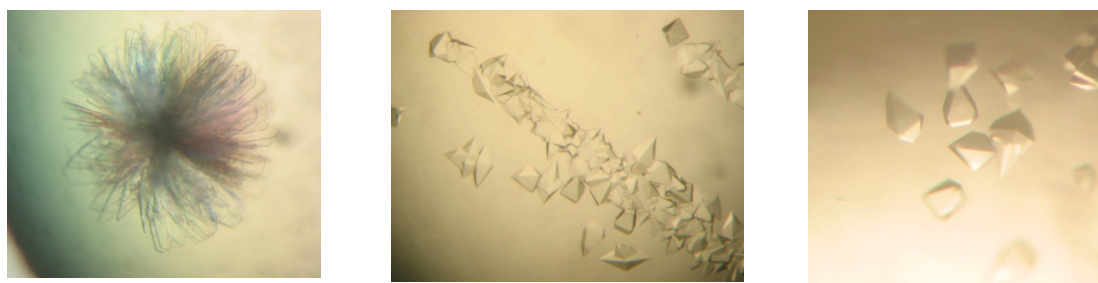


Figure 53 : Optimisation des cristaux de l'AAC(6')-Ib. De gauche à droite : oursin obtenu en tampon phosphate (condition du kit), « trait » d'ensemencement où les cristaux ne sont pas isolés (1,5M K₂HPO₄ 0,06M NaHPO₄ 0,1M guanidine), cristaux isolés exploitables pour la diffraction dans les mêmes conditions.

2) Résolution de la structure

Ces cristaux nous ont permis d'enregistrer un jeu de diffraction à l'ESRF (ligne ID14-3) à une résolution maximale de 1.8 Å. Nous avons résolu la structure par remplacement moléculaire avec le programme Phaser en utilisant l'AAC(6')-Ib₁₁ comme modèle (matériels et méthodes, VIII). L'enzyme cristallise dans le groupe d'espace P4₃2₁2. Les cartes de densité électronique, de très bonne qualité (figures 52 et 53), nous ont permis de reconstruire rapidement l'enzyme avec le logiciel Coot (Emsley et Cowtan 2004). L'affinement a été réalisé avec le programme Refmac (Winn *et al.* 2001). L'enzyme a cristallisé dans le même état d'oligomérisation qu'en solution, c'est-à-dire sous forme de monomère. Nous avons observé dans les cartes de densité un fort signal, distinct de celui de la protéine, localisé dans le site actif. Bien que ne l'ayant pas ajouté dans les cristaux, cette densité électronique s'est avérée être celle du CoA (figure 52). Cette molécule est donc restée fixée à l'enzyme depuis la culture bactérienne. Ceci avait déjà été observé pour l'AAC(6')-Iy (Vetting *et al.* 2004). Quelques parties de la protéine n'ont pu être reconstruites faute de densité électronique. Comme pour l'AAC(6')-Ib₁₁, il s'agit des extrémités C-terminale (9 acides aminés) et N-terminale (11 acides aminés) et d'une portion de la boucle reliant les hélices α 1 et α 2 (les 4 acides aminés 40 à 43).

Nous avons fait diffuser plusieurs aminoglycosides dans ces cristaux. Les premiers essais, réalisés avec l'ajout de kanamycine, ont fait fondre les cristaux, la solution de kanamycine étant très acide. Pour éviter la dissolution des cristaux, l'antibiotique doit être préparé dans la solution de cristallisation (tamponnée) et ajouté progressivement dans la goutte (ajouts successifs de 0,2 μ L d'antibiotique à 10 mM). Les structures de l'enzyme complexée avec le CoA et la néamine ou la kanamycine ont été résolues (figure 54). Par contre, la gentamicine, l'amikacine et la néomycine n'ont pas diffusé dans les cristaux probablement parce que ces antibiotiques, plus encombrants, sont de moins bon substrats et diffusent moins bien à l'intérieur des cristaux. Néanmoins d'autres tentatives devront être effectuées. Les statistiques cristallographiques de l'AAC(6')-Ib complexée au CoA et complexée au CoA et à la kanamycine ou à la néamine sont résumées dans le tableau 9.

| Traitement des données | CoA | CoA, kanamycine | CoA, néamine |
|-------------------------------------|--|---|---|
| Resolution (Å) | 1.8 (37.1) | 2.4 | 2.2 |
| Réflexions uniques | 23836 | 10187 | 13047 |
| Groupe d'espace | P 4 ₃ 2 ₁ 2 | P 4 ₃ 2 ₁ 2 | P 4 ₃ 2 ₁ 2 |
| Paramètres de maille (Å) | a = b = 57.62, c = 146.67 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ | a = b = 57.40 c = 146.67 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ | a = b = 57.33 c = 145.34 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ |
| Complétude ¹ (%) | 100 (99.9) | 100 (99.98) | 99.9 (100) |
| Redondance ¹ | 13.5 (10.5) | 13.4 (11.5) | 13.8 (14.2) |
| I/ σ ¹ | 32.2 (11.4) | 25.7 (11.4) | 26.7 (14.1) |
| R _{sym} ¹ (%) | 5.9 (18.3) | 8.1 (21.3) | 8.2 (18.9) |
| Affinement | | | |
| R _{cryst} | 20.9 (23.8) | 19.4 (20.3) | 18.6 (19.5) |
| R _{free} | 22.6 (28.5) | 23.5 (26.1) | 22.4 (27.0) |
| Facteurs B moyens (Å ²) | | | |
| Total | 15.5 | 15.6 | 16.3 |
| Chaîne principale | 13.6 | 13.7 | 14.0 |
| Chaînes latérales | 14.7 | 14.6 | 18.3 |
| CoA | 25.7 | 42.4 | 41.6 |
| Antibiotique | - | 35.9 | 32.9 |
| Eau | 22.9 | 15.9 | 20.6 |
| Nombre d'atomes | | | |
| Protéine | 1360 | 1356 | 1356 |
| CoA | 47 | 47 | 47 |
| Antibiotique | - | 33 | 22 |
| Eau | 171 | 77 | 116 |
| R.m.s.d | | | |
| Distance (Å) | 0.006 | 0.011 | 0.012 |
| Angles (°) | 1.003 | 1.349 | 1.397 |

¹ Les chiffres entre parenthèses correspondent à la tranche de plus haute résolution

Tableau 9 : Statistiques cristallographiques de l'AAC(6')-Ib complexée au CoA, au CoA et à la kanamycine, et au CoA et à la néamine.

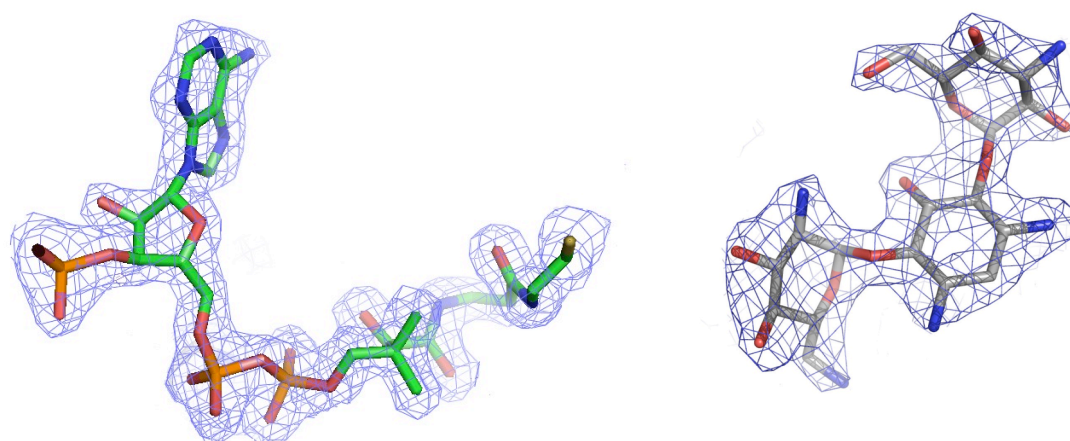


Figure 52 : Cartes de densité électronique 2Fo-Fc du CoA (à gauche) dans la structure du complexe AAC(6')-Ib-CoA et de la kanamycine (à droite) dans la structure du complexe AAC(6')-Ib-CoA-kanamycine contournées à 1 σ .

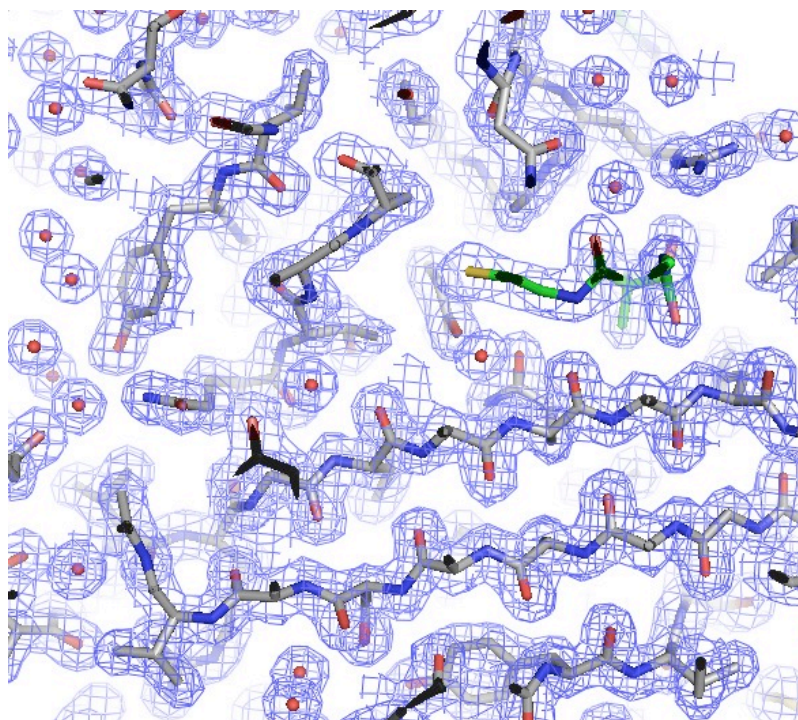


Figure 53 : Carte de densité électronique 2Fo-Fc finale de l'AAC(6')-Ib résolue à 1,8 Å. La protéine et le CoA sont colorés en fonction du type d'atome avec les carbones en gris et en vert respectivement.

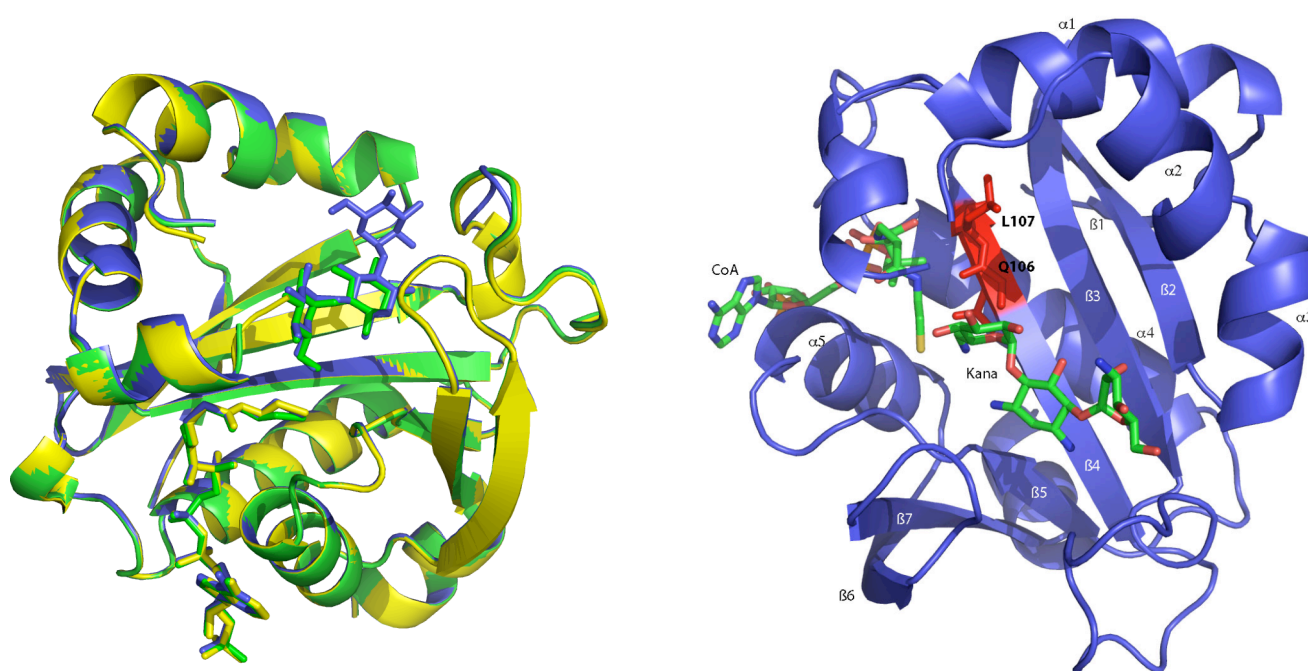


Figure 54 : Structure cristallographique de l'AAC(6')-Ib sauvage complexée avec le CoA et la kanamycine ou la néamine. A gauche : superposition de l'AAC(6')-Ib complexée avec le CoA (en jaune), avec le CoA et la néamine (en vert) et avec le CoA et la kanamycine (en bleu). A droite : structure du complexe avec le CoA et la kanamycine (colorés en fonction du type d'atome avec les carbones en vert). Les éléments de structure secondaire sont indiqués. Les acides aminés mutés dans l'AAC(6')-Ib₁₁ sont colorés en rouge.

La figure 55 montre le site de fixation du CoA. Celui-ci interagit par liaisons hydrogènes avec la chaîne principale du feuillet $\beta 4$ (résidus Q106 et L108). Il interagit également avec la boucle reliant le feuillet $\beta 4$ à l'hélice $\alpha 4$ (G115, G117, G119 et T120) et avec les résidus de l'hélice $\alpha 5$ (K156 et N147 plus particulièrement). Dans cette structure, les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ constituant le "volet" se referment autour de l'extrémité pantéthéine du CoA. Une petite hélice se forme dans ce "volet", entre les résidus 33 et 37, à la place d'une boucle dans la structure de l'AAC(6')-Ib₁₁. Le tryptophane 38 de ce "volet" (appartenant à la boucle reliant cette petite hélice supplémentaire à $\alpha 2$) interagit avec le résidu N147 de l'hélice $\alpha 5$ ce qui forme un tunnel autour du CoA (figure 56 et 58). La fermeture de ce "volet" autour du CoA pourrait permettre le positionnement des résidus importants dans la reconnaissance de l'antibiotique comme le tryptophane 39. La fixation de l'acétyl-CoA avant l'aminoglycoside pourrait alors faciliter la reconnaissance de cet antibiotique et expliquer ainsi le mécanisme ordonné pour la liaison des substrats qui a été rapportée, où la fixation de l'acétyl-CoA précède celle de l'antibiotique. De plus, la fermeture de ce "volet" autour du CoA peut expliquer pourquoi celui-ci reste séquestré dans le site de fixation de l'enzyme au cours des étapes de purification précédant la cristallisation.

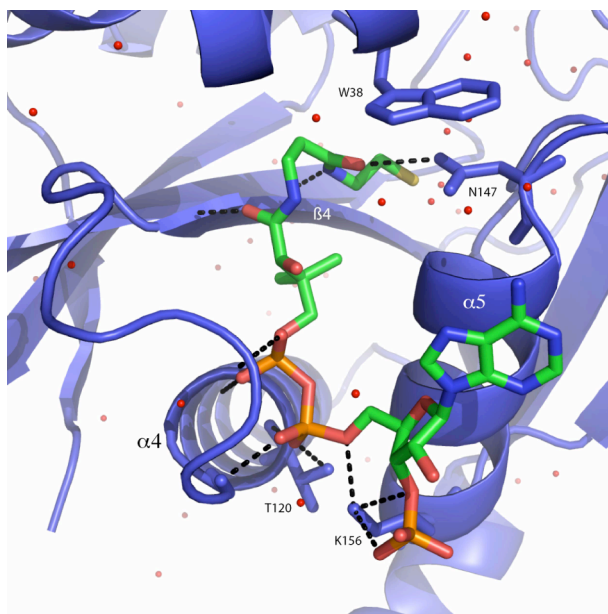


Figure 55 : Site de fixation du coenzyme A sur l'AAC(6')-Ib. Le CoA est coloré en fonction du type d'atome avec les carbones en vert. Les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges

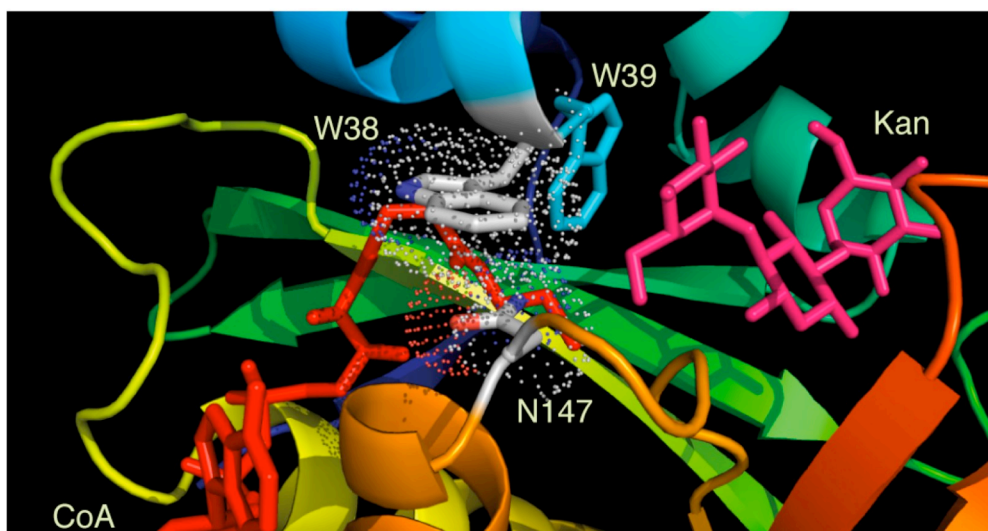


Figure 56 : Fermeture du "volet" autour du CoA. Le résidu N147 est relié au CoA par une liaison hydrogène permettant l'empilement de la chaîne latérale du résidu W38. Le résidu W39 est alors positionné pour s'empiler sur le cycle prime de l'aminoglycoside.

La néamine et la kanamycine se fixent entre les boucles reliant $\beta 3$ à $\beta 4$, $\beta 5$ à $\alpha 5$, $\beta 6$ à $\beta 7$, $\alpha 1$ à $\alpha 2$, et le feuillet $\beta 4$ (figure 57) dans une région de la protéine riche en résidus chargés négativement (aspartate, glutamate) pouvant interagir avec les aminoglycosides chargés positivement (figure 58). Le cycle DOS s'empile sur le tryptophane 92 et le cycle prime (portant la position acétylée) s'empile sur le tryptophane 39. Les fonctions amines des cycles DOS et prime interagissent par liaisons hydrogènes avec les résidus D105 et D142. Pour la kanamycine, le troisième cycle (seconde) interagit également avec l'aspartate 90. La position de la boucle contenant cet aspartate est d'ailleurs modifiée dans la structure du complexe avec la kanamycine par rapport aux complexes avec le CoA seul ou le CoA et la néamine qui ne contient pas ce troisième cycle (figure 54). La reconnaissance de l'antibiotique par l'AAC(6')-Ib se fait donc principalement par des acides aminés situés sur des boucles de surface flexibles permettant de s'accomoder aux différentes structures d'antibiotiques.

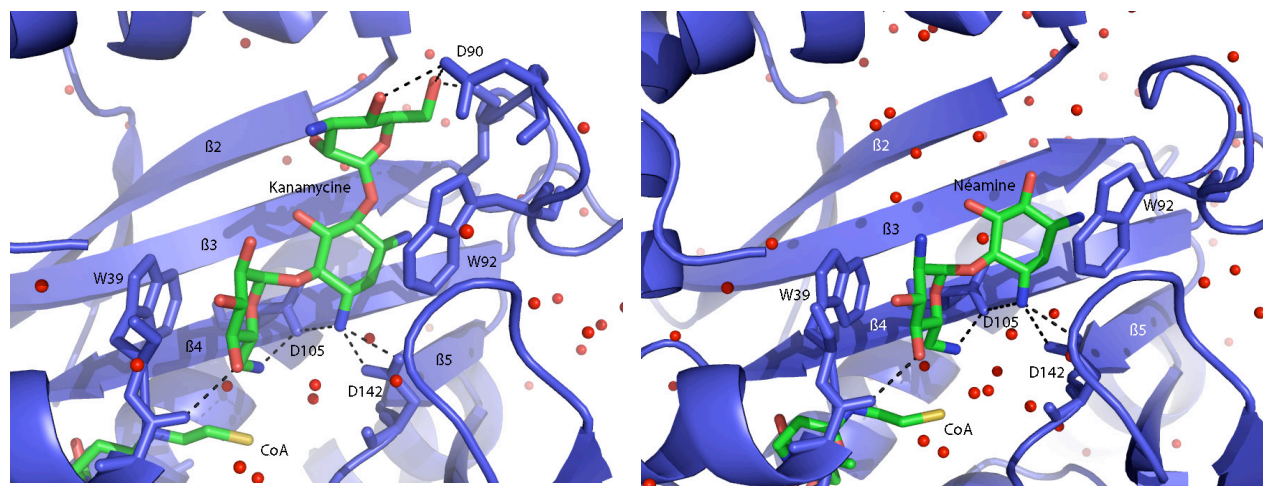


Figure 57 : Sites de fixation de la kanamycine (à gauche) et de la néamine (à droite). Les deux antibiotiques sont colorés en fonction du type d'atome avec les carbones en vert. Les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges.

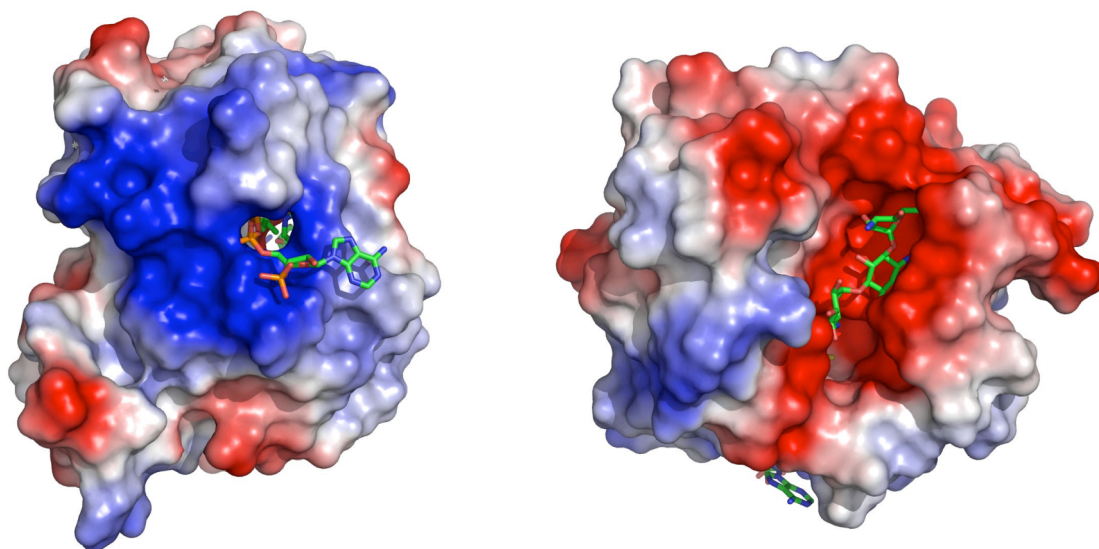


Figure 58 : Surface de l'AAC(6')-Ib colorée en fonction du potentiel électrostatique (calculée avec PyMOL (Delano 2002)). A gauche : site de fixation du CoA, la partie pantéthéine s'insère dans un "tunnel" formé par la fermeture du "volet". A droite : site de fixation de la kanamycine, fortement électro négatif. (code couleur : bleu pour les potentiels positifs, rouge pour les potentiels négatifs)

C) L'AAC(6')-Ib-cr

1) Cristallogénèse

Le variant AAC(6')-Ib-cr (R92, Y169) confère une résistance élargie aux fluoroquinolones (ciprofloxacine et norfloxacine). Il a été purifié dans les mêmes conditions que l'enzyme sauvage et a cristallisé uniquement sous forme d'oursin (figure 59) dans la même solution de cristallisation que l'enzyme sauvage (1,344M K_2HPO_4 et 0,056M $NaHPO_4$). Cependant les tentatives d'optimisation de cette piste de cristallisation n'ont pas donné de résultat. Nous avons alors tenté un ensemencement croisé avec les cristaux de l'enzyme sauvage mais là encore ces tentatives n'ont pas permis d'obtenir des cristaux exploitables pour la diffraction aux rayons X. D'autres tentatives pourront être réalisées en essayant d'autres conditions de purification, d'autres additifs et d'autres kits commerciaux de solutions de cristallisation.

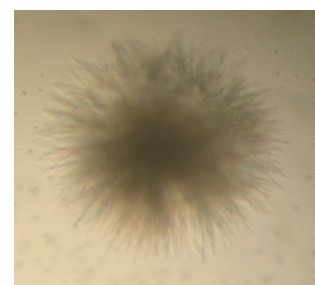


Figure 59 : Piste de cristallisation en oursin obtenue pour le variant Ib-cr

2) Modélisation de la structure

A défaut de structure cristallographique, nous avons modélisé la structure du mutant AAC(6')-Ib-cr avec le programme X-PLOR-NIH (Schwieters *et al.* 2003) en nous basant sur la structure de l'AAC(6')-Ib. Les deux mutations sont localisées dans les boucles de surface formant le site de liaison de l'antibiotique. Nous avons supposé, pour le calcul du modèle, que le repliement global n'était pas significativement perturbé. Dans un premier temps, les deux mutations ont été introduites manuellement dans PyMol, et la structure a été minimisée dans X-PLOR, afin d'obtenir un modèle de la structure de ce variant. La ciprofloxacine a été ensuite positionnée en superposant son cycle pipérazinyle sur celui de l'HEPES, en testant différents rotamères autour de la liaison pipérazine-quinolone. Les modèles ont été affinés par dynamique moléculaire sous contraintes, en fixant la position de l'azote acétylable du cycle pipérazine afin qu'il reste en position dans le site actif. Pour quatre des six rotamères testés pour l'antibiotique, les différents affinements convergent vers des structures très proches dont un exemple est représenté sur la figure 60 avec un agrandissement du site de fixation de la ciprofloxacine. Les deux derniers rotamères n'ont pas convergé vers des structures satisfaisantes sur le plan de la stéréochimie, conservant de nombreuses gênes stériques, elles ont donc été écartées. Les acides aminés mutés, R92 et Y169, situés sur des boucles formant la poche de fixation des antibiotiques (boucles reliant $\beta 3$ à $\beta 4$ et $\beta 6$ à $\beta 7$ respectivement), interagissent avec la ciprofloxacine dans ce modèle. La tyrosine peut

s'empiler sur l'hétérocycle quinolone de la ciprofloxacine et l'arginine peut interagir par liaison hydrogène avec les fonctions oxo ou carboxylique. Il semble donc vraisemblable que ces deux acides aminés mutés, en interagissant directement avec l'antibiotique, permettent la reconnaissance des fluoroquinolones, structuralement différentes des aminoglycosides. Dans notre modèle, la ciprofloxacine interagit également avec le résidu W93 de la boucle reliant $\beta 3$ à $\beta 4$ et le résidu D105 sur le feuillet $\beta 4$. L'étude par cristallographie de ce variant doit être poursuivie pour valider notre modèle.

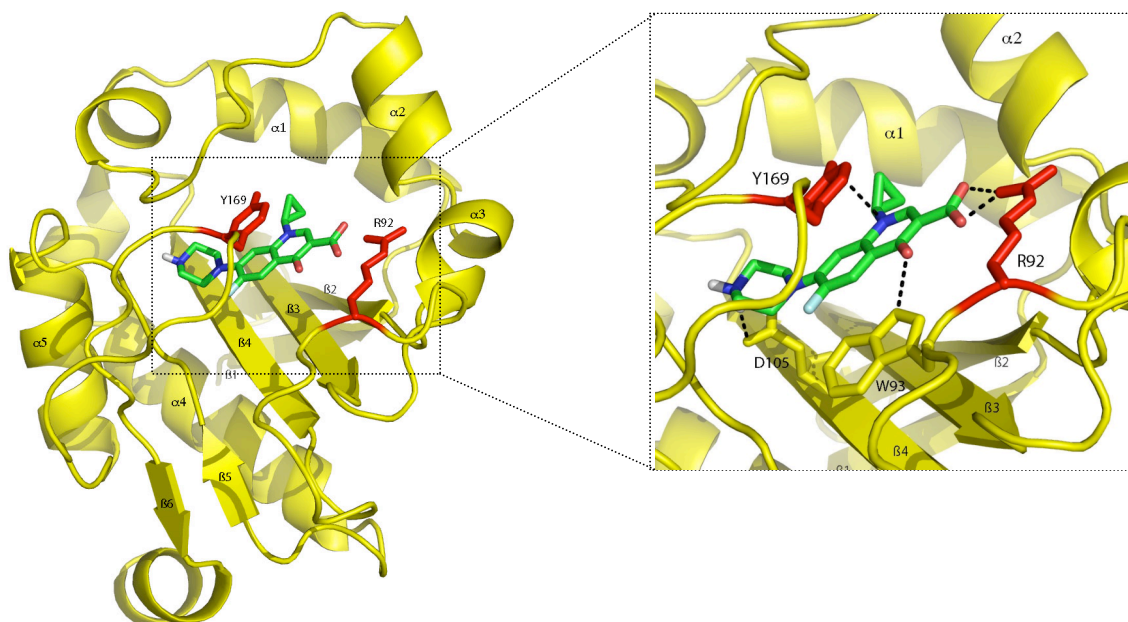


Figure 60 : Modélisation de la structure de l'AAC(6')-Ib-cr complexée avec la ciprofloxacine. Les acides aminés mutés sont représentés en rouge. La ciprofloxacine est colorée en fonction du type d'atome.

D) Comparaisons et analyses des structures

1) Les différents mutants d'AAC(6')-Ib

La résolution de ces structures nous a permis d'apporter une explication possible sur les différents phénotypes de résistance. Pour l'AAC(6')-Ib₁₁, les deux acides aminés mutés L106 et S107, conférant un spectre d'activité plus étendu, ne sont pas en interaction directe avec l'antibiotique. Ces deux mutations déstructurent fortement le feuillet β 4 pour former une boucle. La position des hélices de part et d'autre de ce feuillet β est alors perturbée. En particulier, le "volet" formé par les hélices α 1, α 2 et α 3 est repoussé et ne peut plus interagir avec l'hélice α 5 comme dans la structure de l'enzyme sauvage. La boucle reliant α 1 à α 2 est particulièrement affectée, le tryptophane 38 appartenant à cette boucle est déplacé de 15 Å (figure 61). L'amplitude du déplacement de cette boucle pourrait être amplifiée en partie par la différence d'empilement cristallographique. Néanmoins, la restructuration du feuillet β 4 est réelle et importante et empêche stériquement la fermeture complète du volet, elle représente donc une perturbation majeure. La petite hélice additionnelle présente dans ce volet dans la structure du sauvage ne se forme plus dans la structure du mutant Ib₁₁. Ceci a pour conséquence d'augmenter largement le volume du site de fixation des aminoglycosides (figure 62). L'enzyme peut donc accepter une plus grande variété d'antibiotiques y compris ceux possédant des groupements alkyles encombrants comme l'amikacine ou la gentamicine. Ces mutations n'agissent donc pas directement sur la fixation du ligand mais modifient un élément de structure secondaire perturbant l'arrangement à trois dimensions du site de fixation.

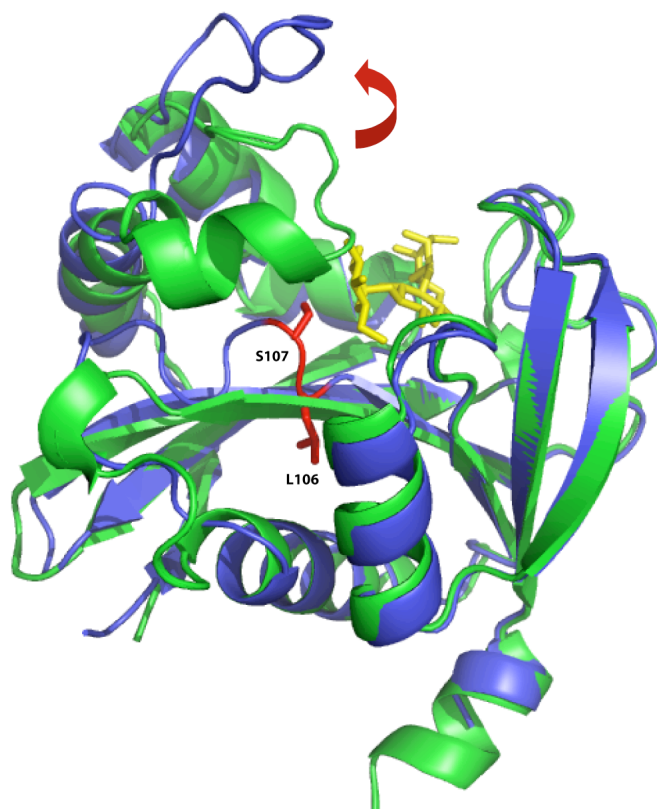


Figure 61 : Superposition de la structure de l'AAC(6')-Ib (en vert) et du mutant AAC(6')-Ib₁₁ (en bleu). Les acides aminés mutés sont représentés en rouge, la kanamycine est représentée en jaune. La flèche indique le décalage du "volet" provoqué par la déstructuration du feuillet β_4 due aux mutations.

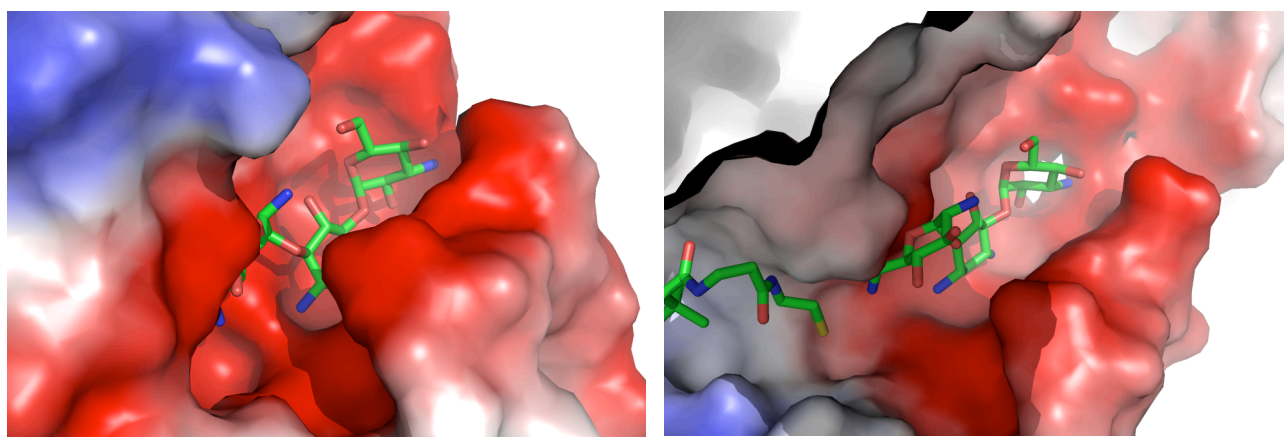


Figure 62 : Comparaison du volume du site de fixation des aminoglycosides dans la structure de l'AAC(6')-Ib sauvage (à gauche) et dans la structure du variant à large spectre AAC(6')-Ib₁₁ (à droite). Pour ce dernier, la position de la kanamycine a été modélisée par rapport à celle observée dans le sauvage. Le volume du site de fixation des antibiotiques est plus important pour le mutant.

L'hélice α_3 , impliquée dans la dimérisation, se situe à l'arrière du "volet" dont la position est fortement modifiée par les mutations. Son orientation est donc modifiée dans le variant AAC(6')-Ib₁₁ ce qui permettrait d'expliquer la différence d'oligomérisation entre l'AAC(6')-Ib et le variant Ib₁₁ (figure 63).

Pour le variant AAC(6')-Ib-Cr, la modélisation de la structure semble indiquer que les mutations, situées sur des boucles, permettent une interaction directe avec le substrat. Ces mutations permettent alors la reconnaissance des fluoroquinolones.

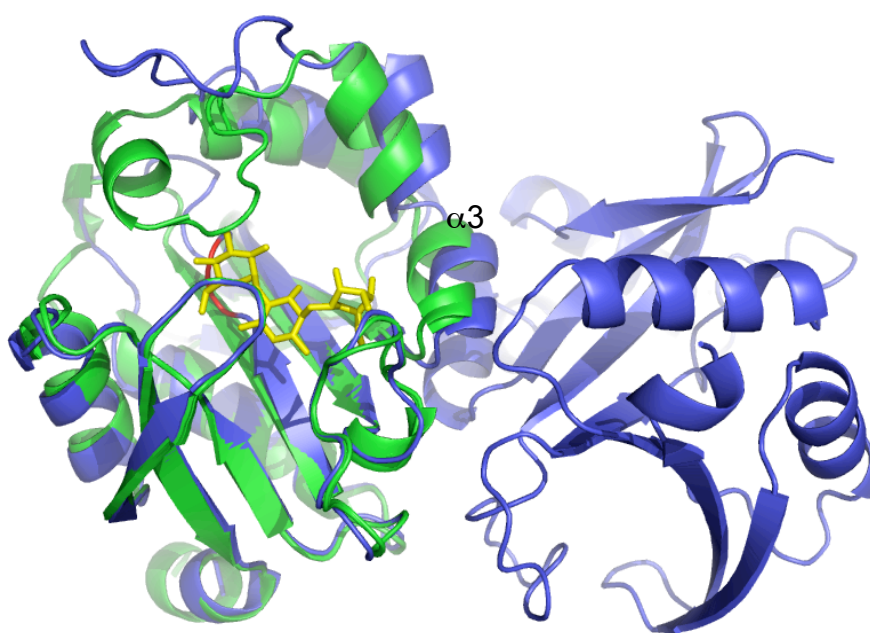


Figure 63 : Superposition de l'AAC(6')-Ib monomérique (en vert) et de l'AAC(6')-Ib₁₁ dimérique (en bleu). La position de l'hélice impliquée dans la dimérisation est modifiée par les mutations, cette hélice étant située à l'arrière du "volet".

Ces travaux ont donné lieu à une publication soumise à EMBO reports, actuellement en révision, présentée à la fin de ce manuscrit.

2) Comparaison avec les AAC(6') de structure connue (Iy et li)

a) Topologie

Le site de fixation du CoA est très similaire dans les différentes structures d'AAC(6'). Par contre, le mode de reconnaissance de l'antibiotique est différent dans l'AAC(6')-Ib. L'AAC(6')-Iy est active sous forme dimérique uniquement puisque le site de fixation de l'antibiotique est formé pour cette enzyme par des résidus provenant des deux monomères (figure 64). Son mode de dimérisation passe par un échange de brin ($\beta 6$) qui vient interagir avec l'antibiotique. L'AAC(6')-li est également dimérique en solution. Aucune structure de cette enzyme complexée avec un antibiotique n'a été résolue. Ceci empêche d'identifier avec certitude les résidus en interaction directe avec le substrat. Cependant, le site probable de fixation de l'antibiotique se situe dans une région de la protéine proche de l'interface avec l'autre protomère suggérant une interaction possible entre l'antibiotique et cet autre protomère (figure 64). De plus, il a été montré qu'une coopérativité existait entre les deux sites actifs de cette enzyme (Draker *et al.* 2003). Au contraire, pour l'AAC(6')-Ib₁₁, dimérique en solution et dans le cristal, le site de fixation des antibiotiques est clairement porté par un seul monomère, indépendamment de l'autre, indiquant une activité possible de l'enzyme sous forme monomérique (figure 64). Ceci est étayé par le fait que les AAC(6')-Ib et AAC(6')-Ib-cr soient observées, en solution et dans le cristal, sous forme monomérique uniquement (voir I, figure 24).

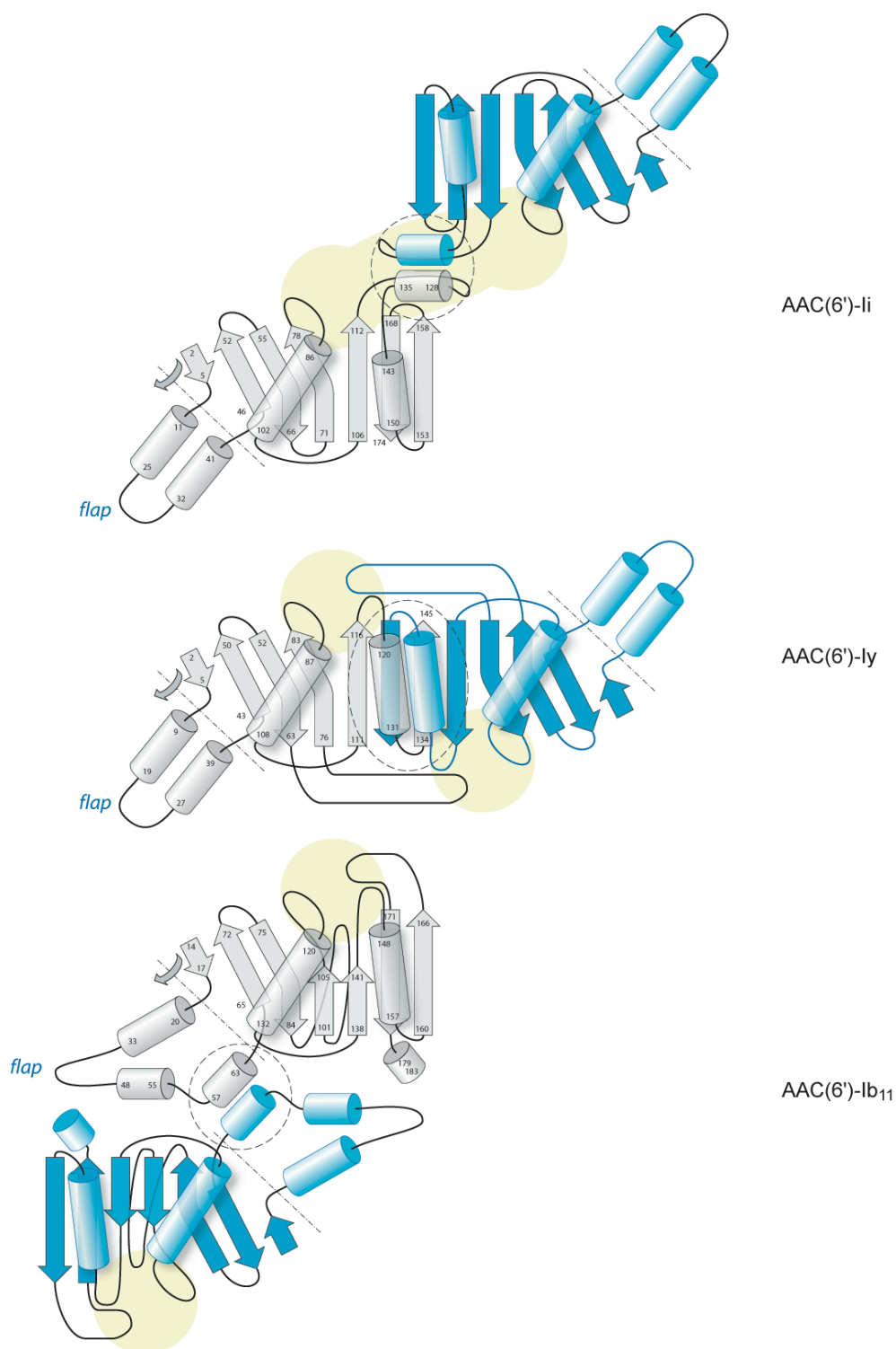


Figure 64 : Topologies comparées des AAC(6')-Iy, Ii et Ib₁₁. Le site de fixation de l'antibiotique est représenté par un disque jaune. L'interface de dimérisation est entourée par des pointillés.

D'autre part, le site de fixation de l'antibiotique pour l'AAC(6')-Iy est prolongé par un long canal chargé négativement à l'interface des deux monomères (figure 65). Ceci suggère que l'AAC(6')-Iy pourrait fixer d'autres molécules polycationiques plus longues que les aminoglycosides comme les lipopolysaccharides par exemple. Le site de fixation de l'AAC(6')-Ib semble plus spécifique des aminoglycosides. L'AAC(6')-Iy pourrait donc avoir une activité physiologique autre que celle de résistance aux aminoglycosides alors que cette activité semble être l'activité principale de l'AAC(6')-Ib.

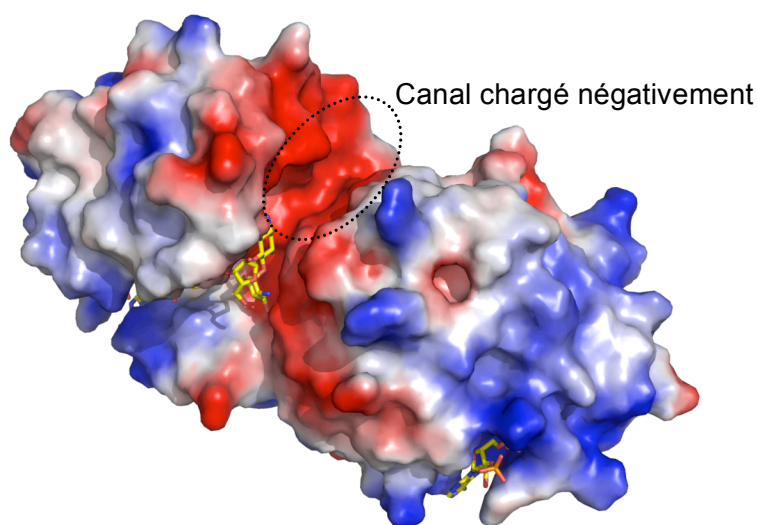


Figure 65 : Surface de l'AAC(6')-Iy colorée en fonction du potentiel électrostatique. Le site de fixation de l'antibiotique se prolonge par un long canal chargé négativement à l'interface des deux monomères.

Dans l'AAC(6')-Ii on observe également un canal chargé négativement, encore plus long, et qui relie les deux sites actifs des deux monomères en une seule profonde crevasse à l'interface du dimère (figure 66). Ceci est indiqué schématiquement sur la figure 64 par la zone en jaune. Des substrats beaucoup plus longs que les aminoglycosides pourraient donc se fixer dans le site actif de cette enzyme comme pour l'AAC(6')-Iy.

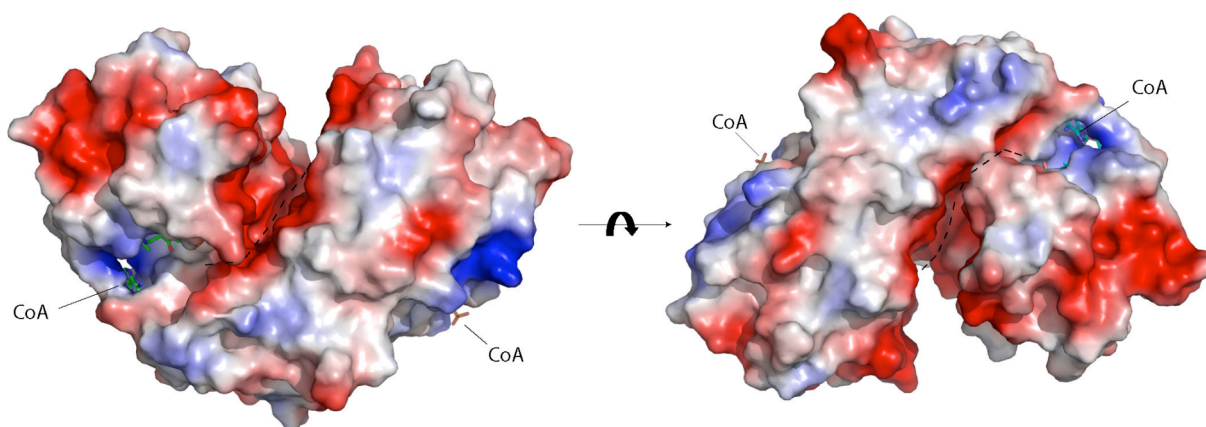


Figure 66 : Surface de l'AAC(6')-Ii dimérique colorée en fonction du potentiel électrostatique. Le canal chargé négativement pouvant être une zone de fixation de substrats est représenté par un trait pointillé noir.

b) Mécanisme enzymatique

Un mécanisme de la réaction catalysée par l'enzyme peut être proposé (figure 67). Ce mécanisme a été décrit pour l'AAC(6')-Iy (Vetting *et al.* 2004) et pour une autre AAC, l'AAC(2')-Ic (Vetting *et al.* 2002). Dans le cas de l'AAC(6')-Iy, l'aspartate 115 joue le rôle de base pour déprotoner l'amine en position 6' des aminoglycosides. Cette réaction s'effectue via une molécule d'eau. Dans le cas de l'AAC(6')-Ib, l'aspartate 142 équivalent pourrait également jouer le rôle de base via une molécule d'eau. Mais un autre aspartate (D105), absent dans les autres AAC(6'), pourrait aussi capter directement le proton de l'amine sans passer par une molécule d'eau (figure 67). Cette différence au voisinage immédiat de l'amine acétylable, par rapport aux autres AAC(6') pourrait jouer un rôle dans son efficacité accrue sur les antibiotiques qui possèdent une amine secondaire, plus difficile à déprotoner, comme la gentamicine. Après cette déprotonation, l'amine 6' située à 3,09 Å de l'atome de soufre du CoA pourrait attaquer directement la fonction thioester de l'acétyl-CoA. L'intermédiaire réactionnel formé présente un atome de carbone asymétrique. Enfin, la tyrosine 154, située à 3,9 Å de l'atome de soufre, pourrait jouer le rôle d'acide pour protoner le thiolate du CoA. Cette tyrosine est équivalente à la tyrosine 126 de l'AAC(2')-Ic, jouant le rôle d'acide dans la réaction catalysée par cette enzyme. Une molécule d'eau, un peu plus près (3,7 Å), pourrait également jouer ce rôle, comme dans le cas de l'AAC(6')-Iy.

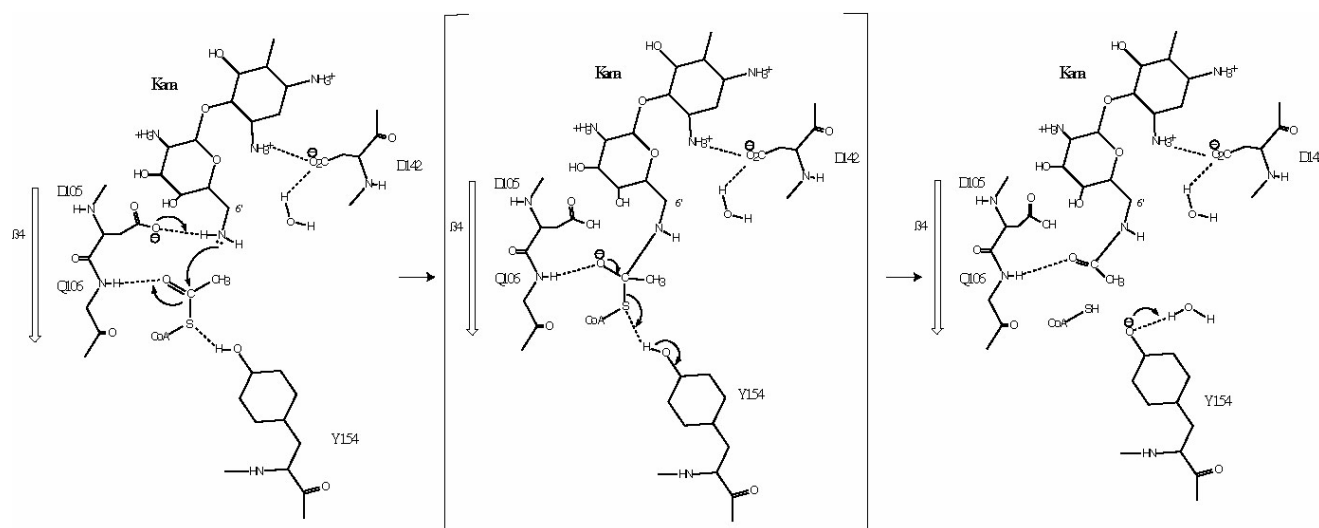


Figure 67 : Mécanisme de la catalyse enzymatique proposé à partir de la structure du complexe ternaire entre l'AAC(6')-Ib, le CoA et la kanamycine.

L'ordre de fixation des substrats lors de la réaction enzymatique est également différent pour l'AAC(6')-Iy et pour l'AAC(6')-Ib. Dans le cas de l'AAC(6')-Iy, la fixation des ligands se fait dans un ordre aléatoire (Vetting *et al.* 2004) alors que pour l'AAC(6')-Ib la réaction est ordonnée, avec l'acétyl-CoA qui se fixe en premier (Kim *et al.* 2007). Comme discuté précédemment, ceci peut s'expliquer par la présence du "volet" qui est plus long dans l'AAC(6')-Ib. La fermeture de ce "volet" autour de l'acétyl-CoA permet de placer les acides aminés interagissant avec l'antibiotique dans une position favorable à cette interaction. La fixation de l'acétyl-CoA avant l'antibiotique permettrait donc de faciliter la liaison de l'antibiotique, ce qui justifierait le mécanisme ordonné. Dans l'AAC(6')-Iy, ce "volet", plus court, ne peut pas se refermer complètement autour de l'acétyl-CoA et on n'observe donc pas de "tunnel" autour du bras pantéthéine. Le substrat se fixant en premier dans le site actif pourrait donc être aléatoirement l'acétyl-CoA ou l'antibiotique.

3) L'AAC(6')-Ib dans la super-famille des GNAT

Le repliement de l'AAC(6')-Ib confirme son appartenance à la super-famille des GNAT. La topologie des protéines de cette superfamille est remarquablement conservée, en particulier le feuillet central ($\beta 1$ à $\beta 5$), en dépit d'identités de séquence de seulement 3 à 23 % (Dyda *et al.* 2000 ; Vetting *et al.* 2005). La figure 68 représente les structures de différentes protéines appartenant à cette super-famille comparée à celle de l'AAC(6')-Ib, les éléments de structure secondaire conservés sont colorés de la même couleur dans chaque structure. Le feuillet central contient des éléments des quatre motifs de séquence conservés (A, B, C, D)

identifiés avant que des informations structurales ne soient apportées (figure 70). Le site de fixation du CoA est très bien conservé au sein de cette super-famille. Les résidus formant le site de fixation du CoA appartiennent essentiellement à des éléments de structure secondaire, formés par des résidus des motifs de séquence conservés.

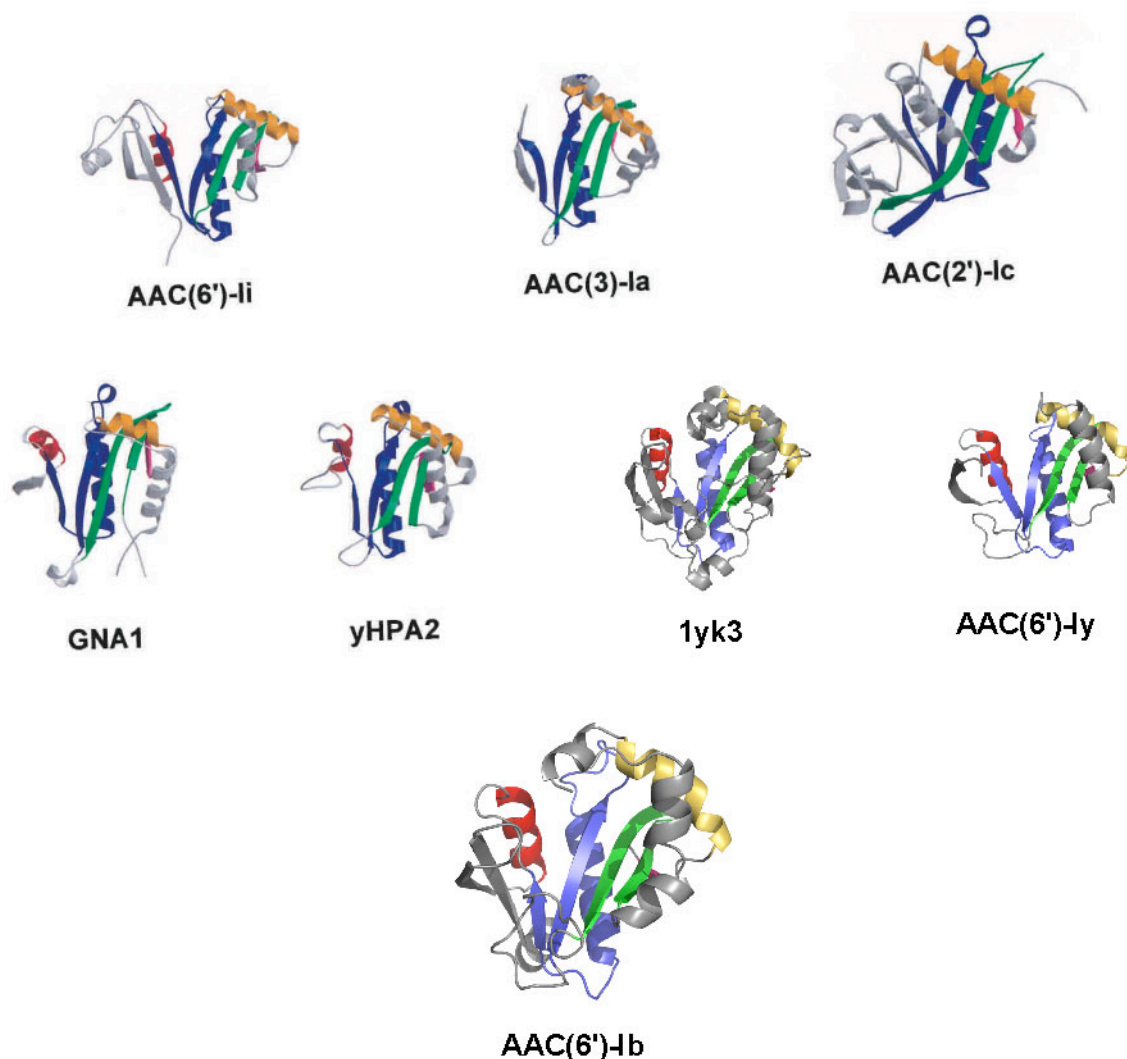


Figure 68 : Comparaison de différentes structures de GNAT. Les éléments de structure secondaire conservés dans l'ensemble des GNAT sont colorés. Adaptée de Burk et al (Burk et al. 2003).

Le feuillet $\beta 4$ contient, dans les structures des GNAT, une “hernie” (β bulge) en son centre formée par deux résidus (Dyda et al. 2000). Ce motif structural, pourtant très bien conservé, n'est pas présent dans l'AAC(6')-lb. Il avait été proposé que cette hernie soit nécessaire à l'ouverture en V du feuillet parallèle formé par les brins $\beta 4$ et $\beta 5$, les résidus de ce renflement effectuant des liaisons hydrogènes avec le brin $\beta 3$. Cette séparation des brins $\beta 4$ et $\beta 5$ induite par cette hernie forme le site de fixation de l'acétyl-CoA. Or ce motif n'est pas présent dans l'AAC(6')-lb mais la même séparation des brins formant le site de fixation du CoA est

observée (figure 69). Cette hernie conservée n'apparaît donc pas comme étant le motif structural nécessaire à la formation du site de fixation de l'acétyl-CoA.

Il ne semble pas exister, au sein de cette super-famille, de résidus catalytiques conservés. Cependant, l'aspartate 142 jouant le rôle de base via une molécule d'eau pour déprotoner l'amine acétylée dans la cas de l'AAC(6')-Iy est partiellement conservé, y compris dans l'AAC(6')-Ib. La présence d'une tyrosine permettant la protonation du thiolate du CoA est également observée dans plusieurs enzymes mais n'est pas conservée dans l'ensemble de la super-famille (figure 70).

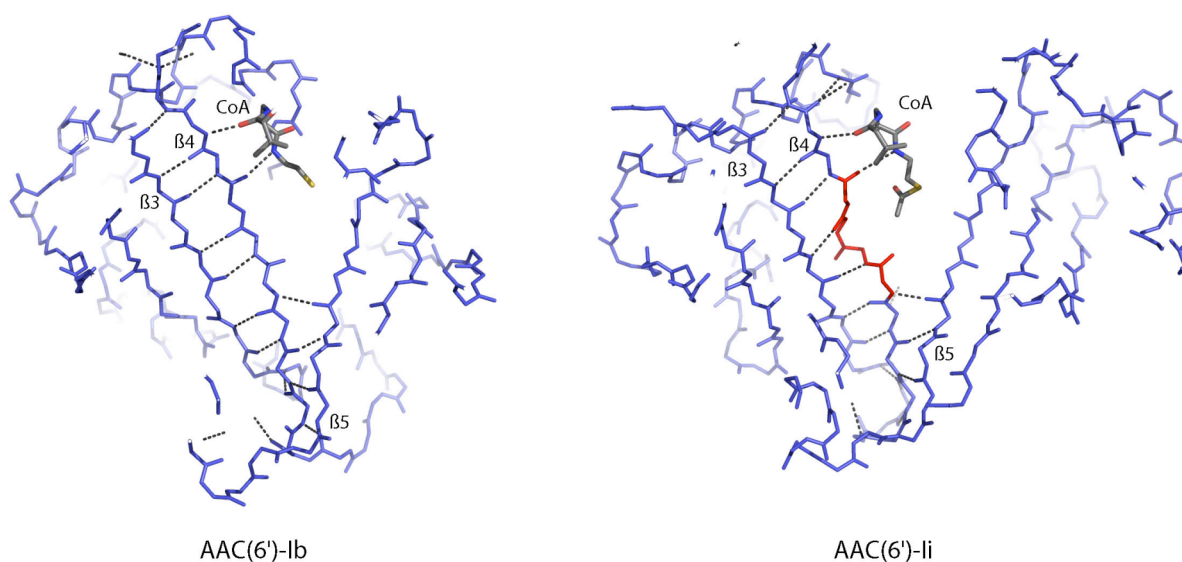


Figure 69 : Comparaison des chaînes principale de l'AAC(6')-Ib et de l'AAC(6')-Ii. La hernie du feuillet β4 de l'AAC(6')-Ii est coloré en rouge

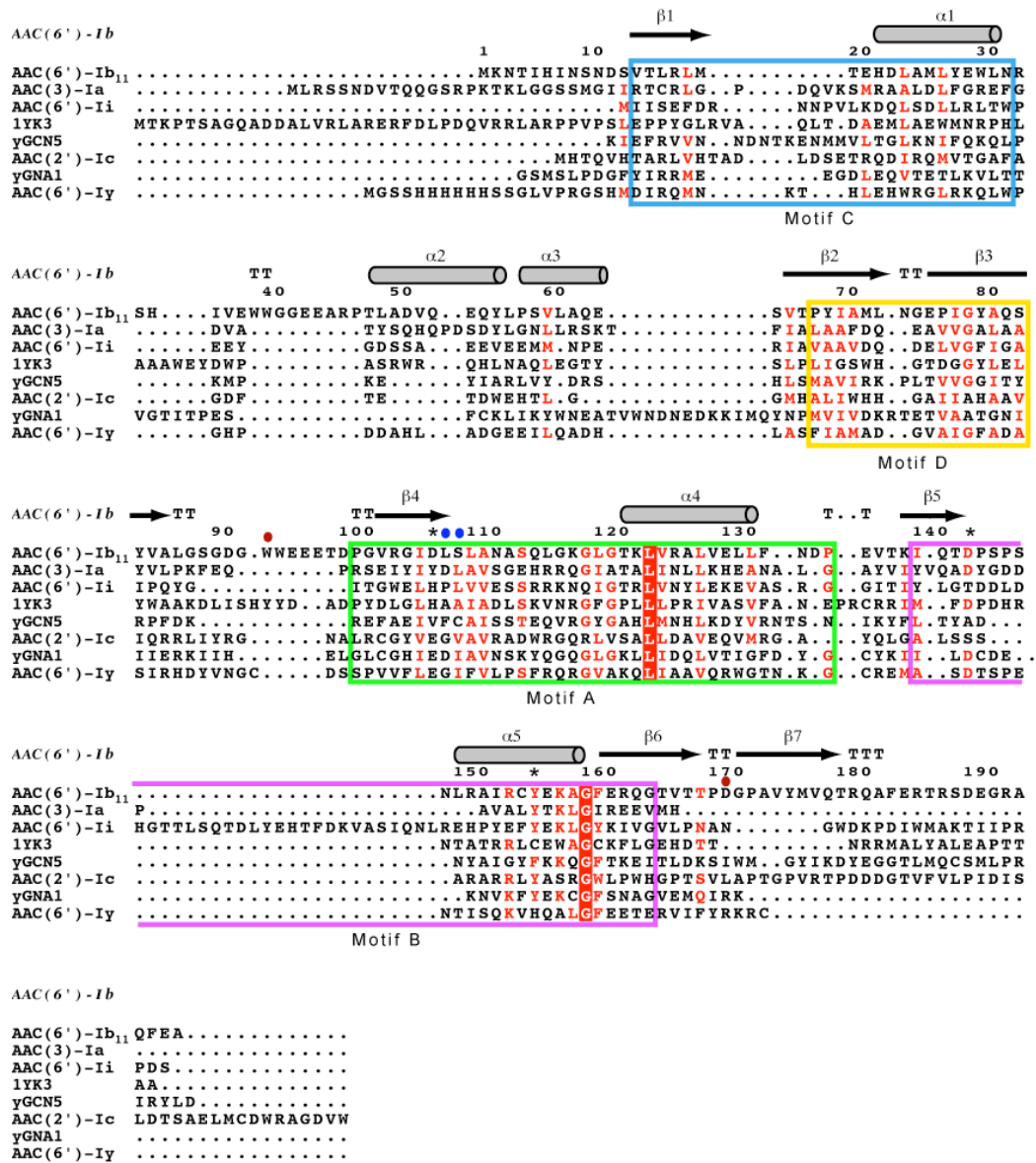


Figure 70 : Alignement de séquence de protéines appartenant à la super-famille des GNAT. La structure de l'AAC(6')-Ib est représentée au dessus. Les résidus conservés sont indiqués en blanc sur fond rouge, les résidus partiellement conservés sont indiqués en rouge. La position des mutations du variant Ib₁₁ sont indiquées par des ronds bleus, celles du variant Ib-cr par des ronds rouges. Les résidus impliqués dans le mécanisme catalytique sont repérés par des étoiles.

Chapitre III : Discussion

Les structures obtenues permettent d'apporter une explication possible sur l'origine structurale des différents phénotypes de résistance conférés par cette enzyme. De plus, ces structures nous ont permis de découvrir un nouveau motif, ligand de l'enzyme, représentant une piste intéressante dans la conception d'inhibiteurs. De nouvelles propositions peuvent être faites dans la stratégie de contournement de la résistance enzymatique aux aminoglycosides.

I. Origine de la résistance

La reconnaissance des antibiotiques par l'AAC(6')-Ib se fait principalement par des boucles, contrairement aux autres AAC(6') de structure connue. Ce mode de reconnaissance par des boucles confère à l'enzyme une plasticité structurale lui permettant de s'adapter plus facilement à d'autres substrats, comme les fluoroquinolones dans le cas du variant AAC(6')-Ib-cr. En effet, des mutations des résidus de ces boucles de reconnaissance ne provoquent pas de changement de repliement de la protéine puisqu'elles ne touchent que des résidus de surface. Pour les autres AAC(6'), l'adaptation à d'autres substrats est plus difficile puisque des éléments de structure secondaire sont impliqués dans la reconnaissance de l'antibiotique et peuvent donc supporter moins de mutations. Ce mode de reconnaissance de l'antibiotique (figure 71) peut expliquer la dissémination importante de cette enzyme et de ces variants dans les souches résistantes. Son adaptabilité aurait facilité sa sélection face à la pression de l'usage des antibiotiques. Le fait que son gène soit porté par un élément mobile (intégron, transposon) a sûrement contribué aussi au "succès" de ce gène dans la population des pathogènes. Cette enzyme est donc une cible importante pour lutter contre ces phénomènes de résistance aux antibiotiques.

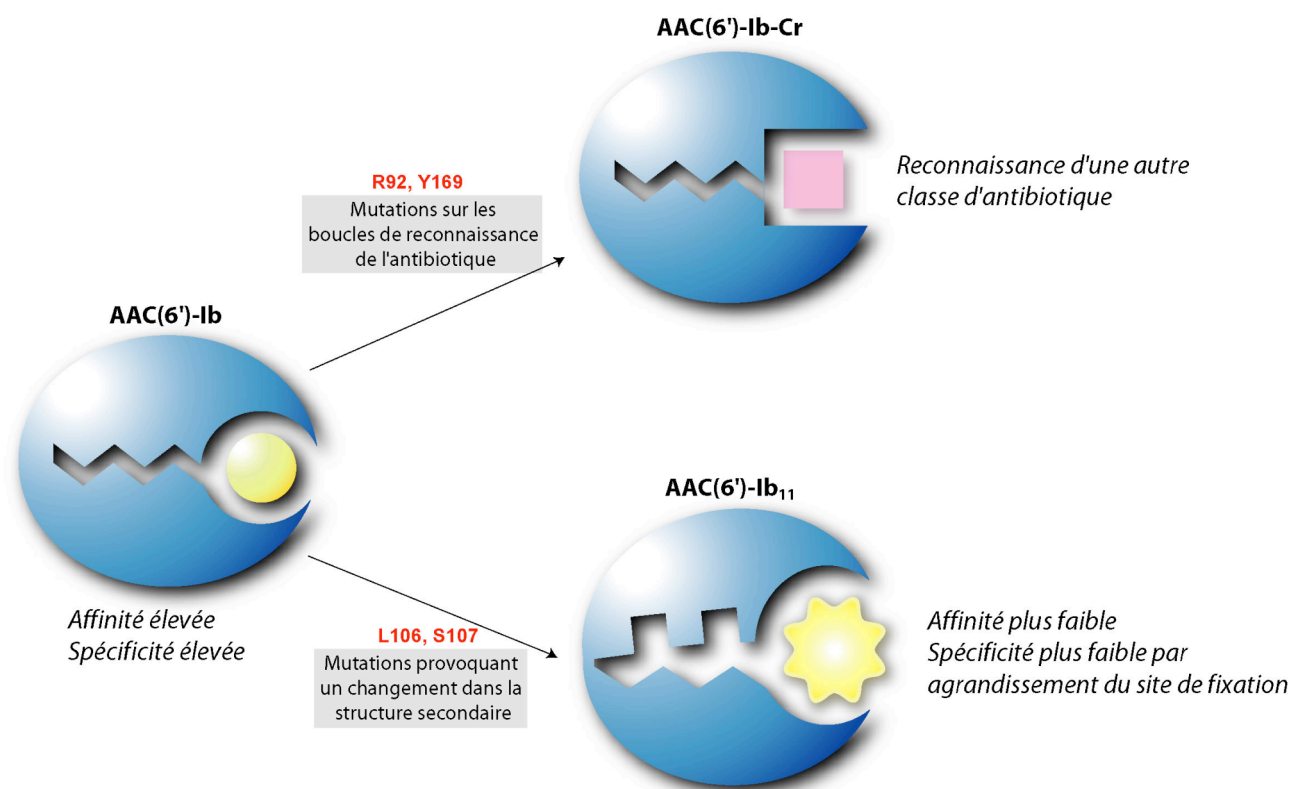


Figure 71 : Représentation schématique du mode de reconnaissance des antibiotiques par les trois formes de l'AAC(6')-Ib.

II. Stratégie de contournement de la résistance

La présence de l'HEPES dans la structure de l'AAC(6')-Ib₁₁ entre le site de fixation du CoA et celui des aminoglycosides est une piste intéressante dans la conception des inhibiteurs. En effet, cette molécule se place dans le site actif de l'enzyme à cheval sur le site de fixation du CoA et sur celui de l'aminoglycoside. L'atome de soufre de l'HEPES se superpose à celui du CoA et l'atome d'azote du cycle piperazinyle est proche de l'atome d'azote de l'amine acétylée des antibiotiques (figure 72). On peut donc considérer que l'HEPES est un analogue minimal de l'état de transition de la réaction d'acétylation. Ceci explique l'affinité de l'enzyme pour cette molécule observée en solution par STD (figure 50). Il est remarquable de noter qu'on retrouve un cycle piperazinyle dans la ciprofloxacine, dont l'azote est acétylé par le variant AAC(6')-Ib-cr. Ceci confirme que le site actif peut accommoder ce pharmacophore et suggère que des fragments de type piperazine-éthane-sulfonate pourraient donc être utilisés dans la conception d'inhibiteurs de cette enzyme.

D'autre part, dans la structure de l'AAC(6')-Ib₁₁, on observe une autre interaction intéressante dans le site actif qui pourrait être exploitée dans la conception d'inhibiteurs. Les chaînes latérales des tryptophanes 38 et 39 d'un symétrique cristallographique s'insèrent en effet à proximité de l'HEPES, dans le sillon où se glisse le bras pantéthéine du CoA, formant des interactions hydrophobes avec l'enzyme. Des molécules associant l'HEPES à un cycle indole ou à une molécule hydrophobe structuralement proche pourraient constituer un ligand de l'enzyme et donc un inhibiteur potentiel (figure 73). Différents fragments hydrophobes pourraient être criblés par les méthodes de RMN utilisées dans cette étude. L'avantage d'une telle molécule serait son caractère hydrophobe, permettant une meilleure pénétration dans les cellules bactériennes, contrairement à l'inhibiteur bi-substrat décrit chapitre II (paragraphe II.E), très polaire du fait de la présence des phosphates du CoA.

Les molécules bi-cycliques dérivées du DACP pourraient être optimisées à partir des informations apportées par la résolution des structures. Cependant, la résolution d'une structure de l'enzyme complexée avec un ou plusieurs de ces produits faciliterait cette optimisation. Des essais de diffusion de ces molécules dans les cristaux de l'AAC(6')-Ib sont en cours.

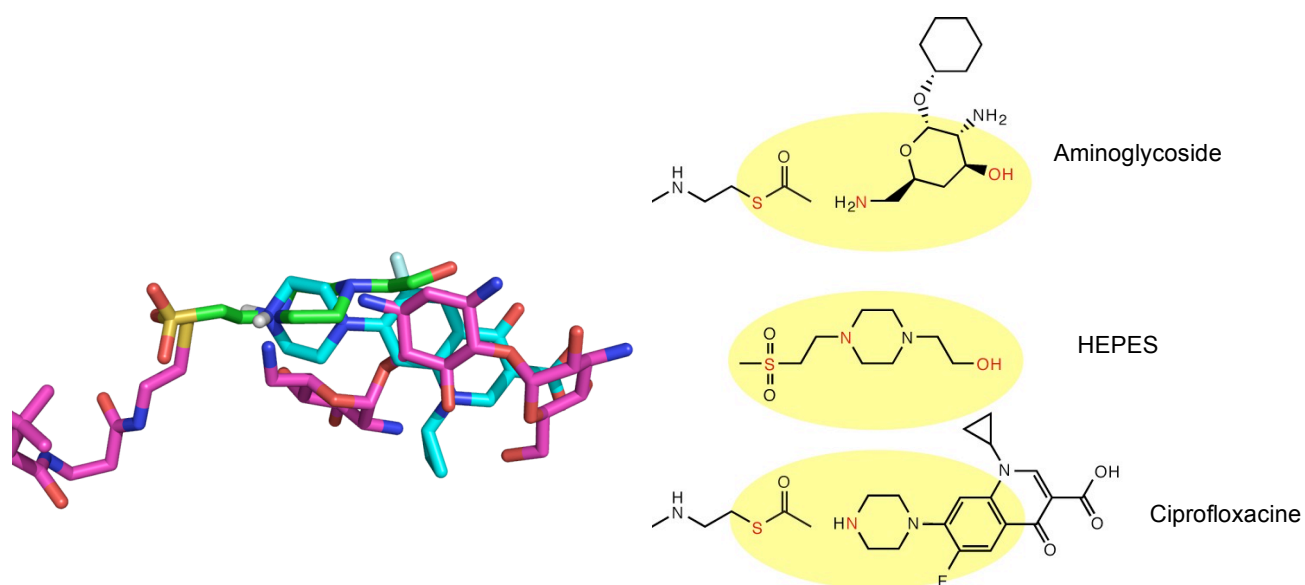


Figure 72 : Comparaison de la structure de l'HEPES avec les ligands de l'AAC(6')-Ib. A gauche : superposition des ligands présents dans les trois structures d'AAC(6')-Ib colorés en fonction du type d'atome avec les carbones en vert pour l'HEPES, en cyan pour la ciprofloxacin et en magenta pour la kanamycine et le CoA. A droite de haut en bas : structure de l'acétyl-CoA avec la kanamycine, de l'HEPES, et de l'acétyl-CoA avec la ciprofloxacin.

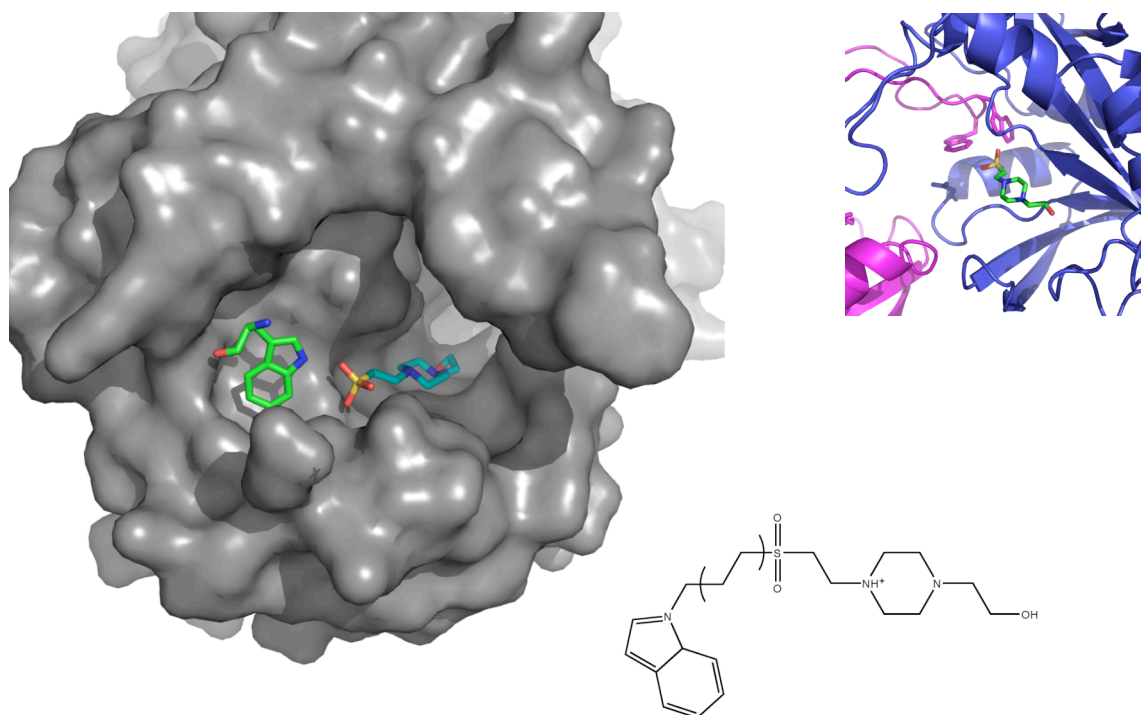


Figure 73 : Insertion des tryptophanes du symétrique cristallographique à proximité de l'HEPES dans la structure de l'AAC(6')-Ib₁₁. A gauche : surface de l'AAC(6')-Ib₁₁, les carbones de l'HEPES sont colorés en cyan, le tryptophane coloré en vert provient d'un symétrique cristallographique. En haut à droite : Contact dans l'empilement cristallin montrant l'insertion de la boucle contenant les tryptophanes. En bas à droite : proposition de structure d'inhibiteur possible basée sur une combinaison d'HEPES et d'indole (ou d'un autre groupement hydrophobe), la longueur optimum de la liaison entre ces deux parties devra être déterminée.

Chapitre IV : Conclusions et perspectives

La résistance aux antibiotiques apparaît aujourd'hui comme un problème de santé publique majeur, en particulier à cause de l'apparition de souches de bactéries multirésistantes, notamment par production d'enzyme de modification des antibiotiques. Nous avons étudié une enzyme de résistance aux aminoglycosides, l'AAC(6')-Ib, codée par un élément génétique mobile. Cette enzyme catalyse l'acétylation des aminoglycosides ce qui empêche leur fixation sur leur cible. Nous avons également étudié deux variants de cette enzyme : le premier confère une résistance étendue à tous les aminoglycosides, le second confère la résistance aux fluoroquinolones, antibiotiques structuralement différents des aminoglycosides. La structure de l'enzyme sauvage a été résolue par cristallographie aux rayons X en complexe avec le CoA et avec le CoA et différents aminoglycosides (néamine, kanamycine). La structure du premier variant a également été résolue par cristallographie. Pour le deuxième variant, nous n'avons pas pu obtenir de cristaux exploitable pour la diffraction ce qui nous a conduit à proposer un modèle de la structure de ce variant. Ces structures nous ont permis de mettre en évidence la plasticité structurale de l'enzyme lui permettant de s'adapter plus facilement à différents antibiotiques (aminoglycosides, fluoroquinolones). En parallèle de ces études structurales, nous avons mis au point un analogue du cycle central des aminoglycosides, le DACP. Cet analogue se fixe sur la cible des aminoglycosides (site A de l'ARN 16S) ainsi que sur l'enzyme de résistance. Ce composé présente l'avantage, contrairement aux aminoglycosides, d'une synthèse simple et de rendement élevé. A partir de cet analogue, nous avons criblé par RMN sur l'enzyme une série de molécules, dérivées de ce mime, et nous avons pu identifier les molécules possédant la meilleure affinité. Ces molécules sont des pistes intéressantes pour lutter contre la résistance enzymatique aux aminoglycosides. A partir de ces molécules, deux stratégies sont possibles : la première stratégie consiste à concevoir de nouveaux antibiotiques, analogues d'aminoglycosides, échappant aux modifications catalysées par ces enzymes (présentant une faible affinité pour l'AAC(6')-Ib), la seconde consiste à concevoir des inhibiteurs de ces enzymes de résistance (présentant une forte affinité pour l'AAC(6')-Ib) utilisés en combinaison avec les aminoglycosides actuels.

Concernant la première approche, les structures des différentes formes de l'AAC(6')-Ib, résolues dans cette étude, apportent une aide précieuse pour la conception d'analogues d'aminoglycosides qui ne soient pas substrats de l'enzyme. Les molécules dérivant du DACP étudiées dans ce travail, représentent une piste de départ pour cette conception de nouveaux antibiotiques. Il est également possible, à partir de la structure de l'AAC(6')-Ib,

d'apporter des modifications sur les aminoglycosides déjà existants. La difficulté étant de modifier l'antibiotique pour empêcher sa fixation sur l'enzyme, tout en préservant son activité, c'est-à-dire en conservant son affinité pour sa cible (le site A de l'ARN16S, pour les aminoglycosides). Mais les aminoglycosides sont des molécules dont la synthèse est particulièrement longue et difficile. Ils sont généralement extraits de cultures bactériennes ou sont pour les plus récents, semi-synthétiques. Cette difficulté de synthèse représente un frein dans la découverte de nouveaux aminoglycosides échappant à la résistance enzymatique. De plus, l'AAC(6')-Ib présentant une forte adaptabilité conférée par sa plasticité structurale, cette stratégie sera probablement un jour contournée par les micro-organismes via l'apparition de nouvelles mutations, permettant la fixation de ces nouveaux aminoglycosides. Pour retarder l'apparition de ces mutations, il est nécessaire de poursuivre en continu la recherche sur les antibiotiques afin d'apporter régulièrement des modifications, ou de nouvelles molécules, afin de devancer l'adaptation des bactéries.

Les structures des AAC(6')-Ib permet également d'envisager la seconde stratégie, à savoir la conception d'inhibiteurs de l'activité enzymatique. Ces inhibiteurs empêcheraient la modification des antibiotiques par l'enzyme en occupant le site actif de l'enzyme. L'inconvénient de cette stratégie d'inhibition repose sur les complications engendrées par la pharmacologie combinée de deux produits. En effet, les problèmes d'administration et d'effets secondaires sont doublés et des interactions médicamenteuses peuvent exister. L'avantage de la stratégie de conception d'inhibiteurs est de pouvoir réactiver l'activité d'antibiotiques aujourd'hui abandonnés à cause de phénomènes de résistance trop importants. Les aminoglycosides étant toxiques, les doses ne peuvent être augmentées pour améliorer leur efficacité face aux souches résistantes. Des inhibiteurs permettraient donc de conserver des doses raisonnables du point de vue de la toxicité. Les différentes structures d'aminoglycosides acétyltransférases résolues permettent d'envisager la conception d'un inhibiteur à large spectre dirigé contre plusieurs acétyltransférases. La région de la fixation des antibiotiques est malheureusement variable dans les structures d'acétyltransférases et largement flexible dans le cas de l'AAC(6')-Ib, sauf au voisinage immédiat du cycle acétylé. Elle représente donc, à notre avis, une mauvaise cible. Pour contourner cette difficulté, l'inhibiteur pourrait cibler une partie constante de ces acétyltransférases comme le site de reconnaissance du CoA, conservé dans les structures des GNAT. Cependant, un inhibiteur ciblant uniquement cette partie risquerait également d'inhiber d'autres acétyltransférases, en particulier chez l'hôte, et de générer des effets indésirables. Un compromis intéressant serait de cibler simultanément un site constant et un site spécifique. La région intermédiaire chevauchant la zone de fixation de l'antibiotique et celle du CoA, où se fixe l'HEPES, (motif piperazine-ethane-sulfonate) répond à ces contraintes et pourrait donc être une bonne cible.

Comme il s'agit directement du site catalytique, les possibilités de mutations conservant l'activité devraient être restreintes et limiter l'apparition de nouvelles résistances. L'observation fortuite de l'affinité de l'HEPES nous paraît donc une opportunité très intéressante car elle fournit une piste pour la conception d'inhibiteurs originaux répondant aux critères ci-dessus. De plus, les dérivés de type pipérazine-éthane-sulfonate pourraient aussi être utilisés pour inhiber l'AAC(6')-Ib-Cr afin de lutter contre l'émergence de la résistance enzymatique aux fluoroquinolones. Nous avons mis au point une méthode de criblage par RMN permettant de sélectionner rapidement des ligands de l'enzyme. Cette méthode de criblage, utilisée pour les molécules dérivées du DACP, peut être appliquée aux dérivés d'HEPES. Nous avons commencé à cribler plusieurs molécules commerciales contenant le motif éthane-sulfonate ou indole afin d'explorer ces pistes, avec des résultats différenciés : certains dérivés se fixent à l'enzyme et d'autres pas. Une étude de relation structure-activité de ces produits permettra d'identifier les pharmacophores importants pour la fixation. La résolution de structures de complexes entre l'enzyme et les produits dérivés du DACP ou de l'HEPES permettrait d'optimiser les structures de ces produits afin d'obtenir un inhibiteur de haute affinité. Ces structures de complexes pourraient être obtenues en faisant diffuser ces molécules dans les cristaux d'AAC(6')-Ib sauvage comme cela a été réalisé pour la kanamycine et la néamine. Il serait également intéressant d'obtenir des complexes avec le variant AAC(6')-Ib₁₁. Pour cela de nouvelles conditions de co-cristallisation ou une nouvelle condition permettant de faire diffuser des antibiotiques ou des inhibiteurs potentiels dans les cristaux devront être découvertes.

La découverte de nouveaux antibiotiques ou de composés inhibant la résistance aux antibiotiques permettrait d'apporter des solutions indispensables pour faire face aux bactéries multirésistantes et aux échecs thérapeutiques qu'elles peuvent engendrer à l'heure actuelle. Cette étude présente de nouveaux composés qui peuvent être utilisés dans cette construction de nouveaux traitements antibactériens. Même si la capacité d'évolution des bactéries leur permettra sans doute un jour de s'adapter aux nouvelles molécules mises sur le marché, la connaissance structurale des mécanismes de résistance est essentielle pour comprendre et prévoir l'adaptation des bactéries et permet donc de mettre en place les stratégies visant à éviter le développement de ces phénomènes de résistance. La résolution des structures de l'AAC(6')-Ib, présentées dans cette étude, représente un atout supplémentaire dans l'étude des mécanismes de résistance enzymatique.

Chapitre V : Matériels et méthodes

I. Production et purification des AAC(6')-Ib

L'ADN plasmidique codant pour l'AAC(6')-Ib₁₁ est extrait avec le kit Midiprep (Qiagen) et introduit par électroporation dans des souches d'*Escherichia coli* BL21 DE3. Les cultures bactériennes sont réalisées à 37°C sous agitation. A $DO_{600nm} = 0,6$, la production de la protéine est induite par l'ajout d'IPTG (0.5 mM final) et la culture se poursuit pendant 2h à 30°C sous agitation. La culture est centrifugée (6000 tr/min) à 4°C. Le culot bactérien est resuspendu dans du tampon HEPES 20mM pH 7,5 supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Calbiochem). Les bactéries sont alors lysées par sonication. Après centrifugation à 13000 tr/min, le surnageant est récolté. Des tests préliminaires ont montré que les conditions optimales de solubilité de la protéine étaient à pH 7,5 et en absence de sel. La purification de l'AAC(6')Ib₁₁ a donc été effectuée dans en tampon HEPES pH7,5 en présence de DTT (1mM) pour éviter l'oxydation des cystéines (et ainsi éviter la formation de ponts disulfures intermoléculaires) et de 1mM EDTA pour limiter la protéolyse (tampon A). La purification s'effectue à 4°C en deux étapes et la pureté de la protéine est contrôlée sur gel SDS-PAGE (figure 75). La première étape de purification est une échangeuse d'anions (Q sepharose, Amersham). La colonne est préalablement équilibrée en tampon A puis l'extrait brut est chargé sur la phase. Après lavage de la colonne en tampon A, un gradient de sel (0 à 500 mM NaCl) est effectué pour éluer la protéine d'intérêt. Les fractions contenant la protéine sont réunies, dialysées pour éliminer l'excès de sel, puis concentrées jusqu'à un volume de 10mL. Le deuxième étape de purification est une filtration sur gel (Superdex 75, 230mL, Amercham) réalisé en tampon A. Les fractions contenant l'enzyme pure sont concentrées (15 à 20 mg/mL) sur centriprep (Millipore). Pour les deux autre enzymes, sauvage et mutante Ib-cr, la purification s'effectue selon le même protocole, excepté le remplacement du tampon HEPES par du tampon Tris-HCl au même pH. La concentration de l'enzyme est controlée par mesure de l'absorption à 280nm. Le rendement final de purification est de 20 à 40 mg par litre de culture en moyenne pour les trois enzymes.

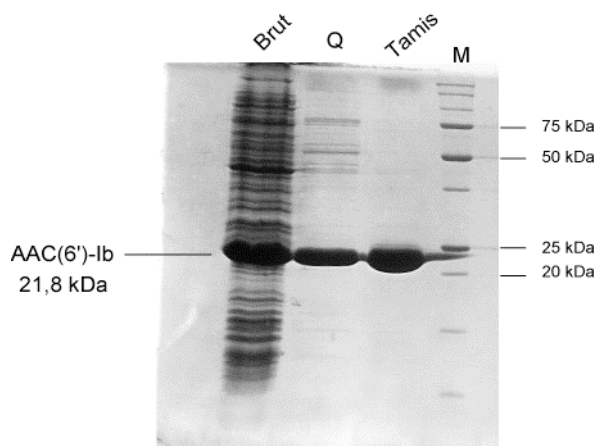


Figure 75 : Gel SDS-PAGE des différentes étapes de purification de l'AAC(6')-Ib₁₁. Brut : dépôt d'un extrait cellulaire après sonication et centrifugation, Q : dépôt après colonne échangeuse d'ions Q-sépharose, Tamis : dépôt après le tamis moléculaire, dernière étape de purification. M : marqueurs de poids moléculaire.

Pour produire l'enzyme sous sa forme sélénée sur les méthionines, une préculture de 50mL en milieu LB est réalisée sur la nuit à partir d'un stock glycerol de l'enzyme AAC(6')-Ib₁₁. Après centrifugation, le culot bactérien est lavé deux fois avec du tampon Tris-HCl 20mM, NaCl 200mM, pH 8 stérile, puis est ajouté dans un litre de milieu minimum supplémenté de 20mg/L de sélénométhionine. La culture se poursuit à 37°C jusqu'à une turbidité de 0,6 (absorbance à 600 nm). L'induction est alors réalisée par l'ajout d'IPTG (0,5mM) et l'incubation est poursuivie pendant deux heures à 30°C. La purification de la protéine sélénée s'effectue dans les mêmes conditions que pour la protéine native.

II. Test d'activité *in vitro*

Pour déterminer l'activité enzymatique de l'AAC(6')-Ib, nous avons utilisé le protocole décrit par Magnet *et al* (Magnet *et al*. 2001). L'acétylation de l'aminoglycoside libère un groupement sulfhydryle libre sur le coenzyme A, qui réagit avec le DTNB (reactif d'Ellman, acide-5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)) pour former du 5-thio-2-nitrobenzoate. Ce dernier composé absorbe à 412 nm (jaune) (figure 76). L'activité enzymatique peut donc être repérée en mesurant sur un spectrophotomètre l'augmentation de l'absorbance à 412 nm (figure). Le mélange réactionnel contient du tampon HEPES 50 mM pH 7.5, de l'acétyl-CoA 50 µM, ainsi que 50 µM de substrat (le tampon phosphate a également été utilisé et aucune différence significative d'activité n'a été observée). La réaction est initiée par ajout d'une

petite quantité d'enzyme (0.5 μM) dans un volume total de 600 μL . Après 15 min d'incubation, 0.8 mM de DTNB sont ajoutés au mélange réactionnel puis la densité optique à 412 nm est mesurée et comparée à celle d'un mélange sans substrat. On réalise ainsi des mesures en point final et non pas en cinétique continue, ce qui aurait été théoriquement possible en ajoutant le DTNB dès le départ dans le mélange réactionnel. Nous avons en effet observé que le DTNB a un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique. Il semble vraisemblable que le DTNB réagisse avec la cystéine 153, qui est accessible dans la crevasse de liaison de l'acétyl-CoA et interfère donc avec la liaison du cofacteur.

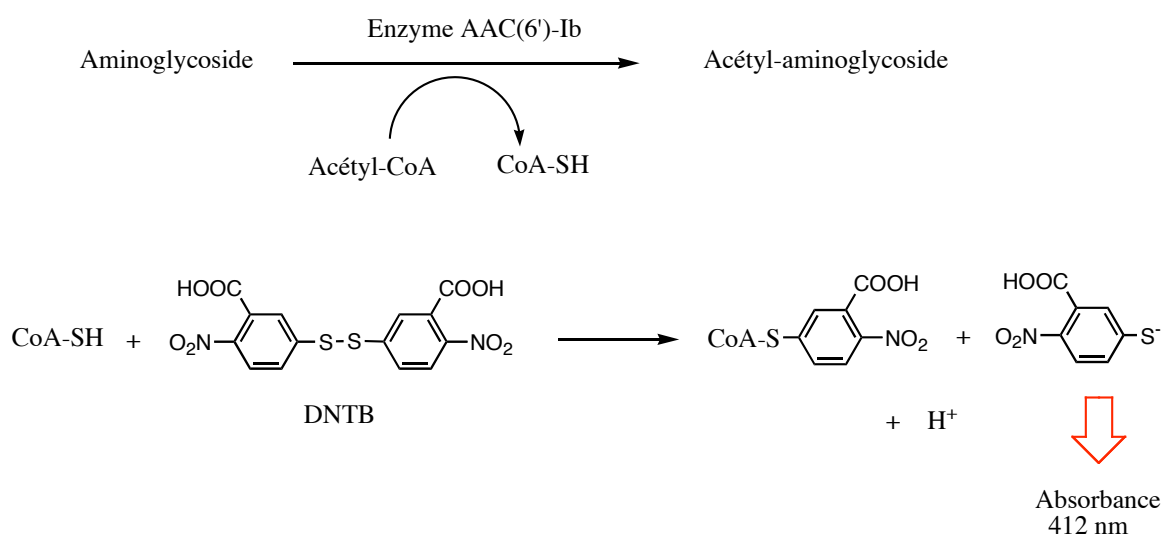


Figure 76 : Schéma du principe du test d'activité enzymatique

III. Mesure de CMI

Les CMI ont été mesurées en milieu LB solide ou liquide. 20 μL de dilution de culture de bactérie (environ 10^4 cellules/mL) sont étalés sur 1 mL de milieu LB, additionné de concentrations croissantes d'antibiotique, solidifié dans les puits d'une boîte Linbro. Après 18h à 37°C les colonies sont dénombrées sur chaque puit correspondant à une concentration d'antibiotique. La première concentration d'antibiotique pour laquelle aucune colonie n'est observée est prise pour valeur de CMI. Les CMI peuvent également être mesurées en milieu LB liquide selon le même protocole. L'absence de croissance bactérienne provoqué par l'antibiotique à la valeur de CMI est contrôlée en mesurant la turbidité de chaque échantillon (absorbance à 600 nm).

IV. RMN

Tous les spectres RMN sont enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 600 MHz équipé d'une sonde inverse triple résonance équipée de gradients z. Les données sont traitées sur une station Silicon Graphics par le logiciel Gifa.

1) Marquage isotopique à l'azote 15

Pour obtenir les empreintes RMN de la protéine seule ou en présence de ligand, nous avons réalisé un marquage à l'azote 15. Nous avons utilisé le même système d'expression que pour la protéine native. Le milieu de culture est un milieu commercial marqué à l'azote 15 (Martek 9) supplémenté d'hydrolysate de cellule (5mg/L) également marqué à l'azote 15 (Celtone). La culture et la purification de la protéine marquée sont effectués dans les mêmes conditions que pour la protéine non marquée.

2) Spectre TROSY

Les spectres à deux dimensions TROSY (*Transverse Relaxation Optimized spectroscopy*) (Pervushin *et al.* 1997) de l'enzyme marquée à l'azote 15 ont été réalisés. Ces expériences ont permis d'obtenir les empreintes de fixation des ligands sur la protéine. L'expérience TROSY est une optimisation de l'expérience HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) qui permet d'augmenter la sensibilité et la résolution des spectres. En effet, cette expérience permet la diminution de la relaxation transverse par suppression de corrélation croisée entre anisotropie de déplacement chimique et couplage dipôle-dipôle. Les transitions possédant les vitesses de relaxation les plus faibles parmi les quatre transitions simple quantum caractéristiques d'un système de deux spins couplés sont sélectionnées. Au lieu d'observer la moyenne des quatre transitions, on observe la transition donnant la raie la plus fine.

3) Saturation Transfer Difference (STD) et Reverse NOE pumping (RNP)

Les échantillons contiennent 1 mM de substrat et 20 μ M d'enzyme dans 180 μ l de tampon phosphate 20 mM, 10 % v/v D₂O, pH 7.5. Un robot de pipetage Gilson injecte les échantillons automatiquement dans la sonde à flux continu. Tous les spectres sont enregistrés à 298 K, la suppression d'eau est effectuée par "excitation sculpting" (Hwang

1995). Nous avons utilisé un “spin lock” (ou filtre $T_{1\rho}$) de 100 ms ($B_1=4600$ Hz) après l’impulsion de lecture de 90° pour éliminer le signal de la protéine.

Pour les expériences STD, l’irradiation est effectuée avec la porteuse à 0.5 ppm pendant 1 seconde pour le spectre STD lui-même et à 20 ppm pour le spectre “hors-résonance”. Les résonances des protons des groupements méthyles de la protéine étant relativement proches des résonances de la kanamycine, nous avons essayé de saturer la région des aromatiques (7 ppm) de la protéine. Nous avons également diminué la puissance d’irradiation (environ 100 Hz au lieu de 200 Hz). Dans tous les cas, les spectres STD sont restés similaires. La présaturation sélective d’une bande de fréquence de la protéine est effectuée par un train d’impulsions gaussiennes de 50 ms séparés par un délai de 1 ms. La séquence d’impulsion (figure 77) est la suivante : délai de relaxation, train d’impulsion de présaturation, 90° , filtre $T_{1\rho}$, suppression du solvant, acquisition. Un cyclage de phase effectue la différence des spectres STD et du spectres “hors-résonance”, une expérience sur deux.

Pour les spectres RNP, le délai de transfert NOE est de 700 ms pour permettre la détection des interactions faibles. La séquence d’impulsions de cette expérience est présentée figure 78.

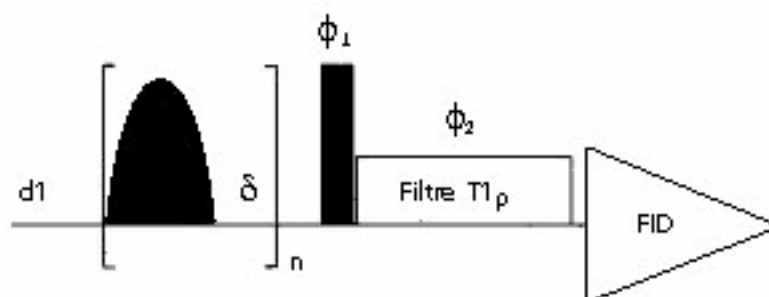


Figure 77 : Séquence d’impulsions de l’expérience STD sans suppression d’eau.

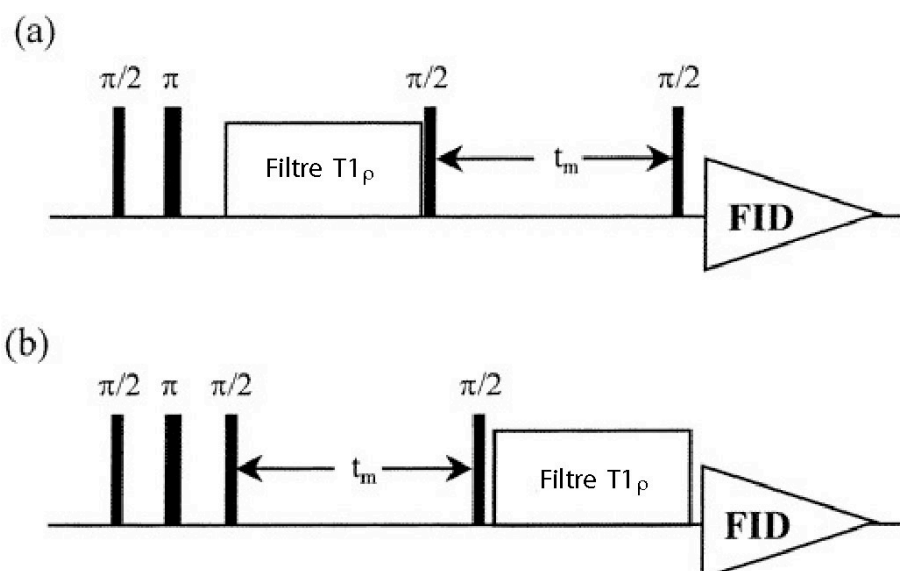


Figure 78 : Séquences d'impulsions de l'expérience RNP. (a) : expérience RNP, (b) : séquence du spectre référence

V. Mesure de constantes de dissociation

Les constantes de dissociation des différents composés ont pu être mesurées par fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre JASCO FP6200 équipé d'une cellule thermostatée. Toutes les mesures ont été effectuées à 21°C. La concentration de l'enzyme dans la cuve est de 1.8 μM dans 1 mL de tampon phosphate de potassium 20mM, 150 mM KCl, pH 7.5. La fluorescence intrinsèque des tryptophanes est excitée à une longueur d'onde de 280nm et détectée à 345 nm, maximum d'émission de la protéine. Quatre des cinq tryptophanes de l'enzyme sont situés au voisinage direct des substrats, et deux d'entre eux, Trp39 et Trp92, s'empilent sur les cycles de l'aminoside. L'ajout de quantités croissantes de ligand se traduit par une extinction importante de fluorescence, ce qui permet d'accéder aux paramètres thermodynamiques de l'interaction. Ceux-ci ont été déterminés par régression non linéaire itérative.

VI. Antibiotogrammes

Les antibiotogrammes sont réalisés selon la méthode de Kirby-Bauer (Bauer *et al.* 1966). Une préculture de bactéries (*E. coli* JM101) est effectuée pendant une nuit à 37°C, cette préculture est diluée au dixième dans une solution MgCl₂ 10 mM. 50 µL de cette dilution sont mélangés dans 5 mL de milieu agar dilué H-TOP (NaCl 8g/L, tryptone 10g/L, agar 8g/L) maintenu en surfusion à 50 °C et versés sur une boîte de Pétri préalablement remplie de 20mL de milieu LB agar solide. Un disque de papier Watman imbibé de 10 µL de l'antibiotique à tester est déposé sur la boîte après solidification du milieu H-TOP contenant les bactéries. Plusieurs antibiotiques peuvent être testé sur une même boîte de Pétri. Les boîtes sont alors disposées 18h à 37°C. Un disque d'inhibition de croissance des bactéries est observé autour du dépôt d'antibiotique. La concentration de l'antibiotique doit être suffisamment grande pour observer un disque mais pas trop élevée pour ne pas que les différents antibiotiques se mélangent. Typiquement, les concentrations utilisées étaient de 1 à 5 mM pour les aminoglycosides et de 50mM pour les produits synthétisés "GB". Pour tester l'activité inhibitrice des molécules *in vivo*, la même technique est employée en comparant la taille du disque d'inhibition de croissance des bactéries pour 5 µL d'antibiotique (100 µM final) + 5 µL d'eau ou pour 5 µL d'antibiotique + 5 µL d'inhibiteur potentiel à 50mM. Si l'inhibiteur est actif, la taille du disque d'inhibition de croissance des bactéries doit être plus grand en présence de cet inhibiteur (activité de l'antibiotique restaurée).

VII. Mesure de CI₅₀

Les valeurs de CI₅₀ de la néamine et du GB109 ont été mesurées à partir du kit de transcription-traduction couplée (Easy Xpress protein synthesis mini kit, Qiagen). Des concentrations croissantes d'antibiotique sont ajoutées à chaque tube contenant le mélange réactionnel. La réaction est démarrée par l'ajout de l'ADN matrice et les tubes sont incubés à 37°C pendant une heure. La réaction est arrêtée sur la glace. La protéine traduite par ce kit est alors purifiée sur résine de nickel. Un extrait de chaque échantillon est déposé sur gel SDS-PAGE. Après migration, le gel est coloré au bleu de coomassie. Les bandes de ce gel, correspondant à la protéine traduite, sont découpées pour chaque concentration d'antibiotique. Ces bandes sont placées dans de l'isopropanol 50% (v/v) et chauffées à 37°C pendant 10 minutes pour désorber le bleu de coomassie des bandes. L'absorbance est alors mesurée à 595 nm. La quantité de bleu étant sensiblement proportionnelle à la quantité de protéine sur le gel, nous avons pu estimer la valeur de concentration d'antibiotique pour laquelle une diminution de 50% de la protéine traduite était observée, c'est à dire la valeur de CI₅₀.

VIII. Cristallographie aux rayons X

1) Cristallogénèse

Les tests de cristallisation ont été réalisés en utilisant la technique de diffusion de vapeur en gouttes suspendues. Les essais sont effectués en boîtes Linbro de 24 réservoirs contenant chacun 500 μL de solution de cristallisation. Les gouttes sont formées de 1,5 μL de solution de protéine concentrée (15 à 20 mg/mL) et de 1,5 μL de solution du réservoir. Ces gouttes sont déposées sur une lamelle de verre siliconée qui est ensuite retournée sur le réservoir préalablement graissé (figure 79). L'équilibre s'établit entre la goutte et le réservoir par diffusion des composés volatiles jusqu'à ce que la tension de vapeur soit la même dans la goutte et dans le réservoir. La goutte étant plus diluée que le réservoir, la concentration de cette goutte augmente. La protéine qui ne diffuse pas reste dans la goutte et se trouve elle aussi concentrée. L'état de sur-saturation s'établit donc progressivement en augmentant simultanément la concentration de la protéine et de l'agent précipitant, ce qui peut conduire à l'obtention de cristaux (figure 80). La figure 81 montre les photographies des cristaux obtenus pour les AAC(6')-Ib et Ib₁₁ ainsi que les conditions de cristallisation correspondantes.

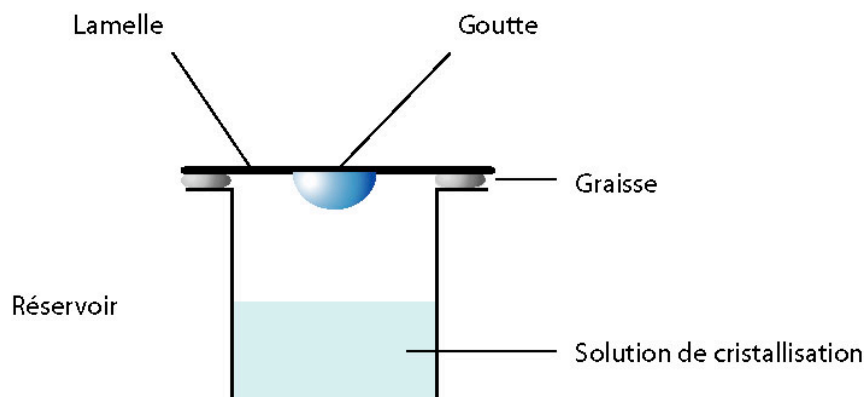


Figure 79 : Schéma représentatif de la méthode de diffusion de vapeur en gouttes suspendues.

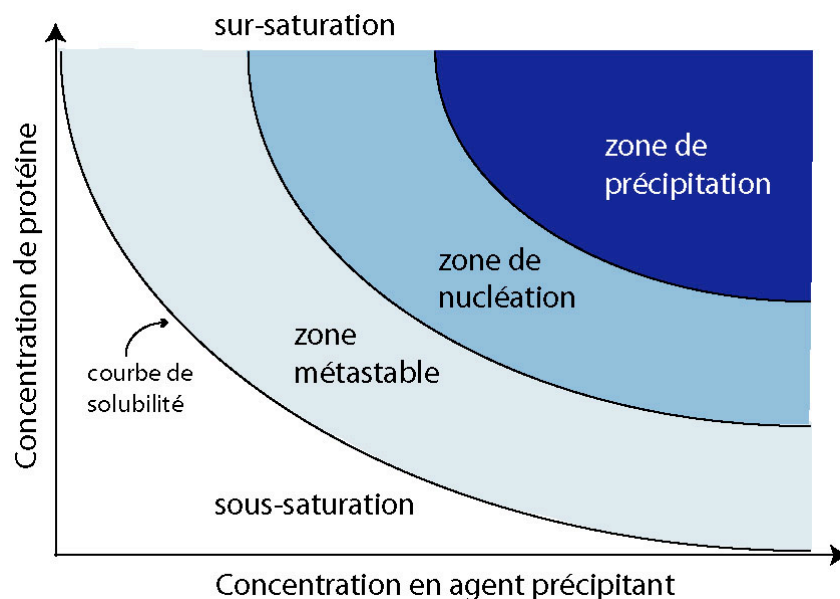
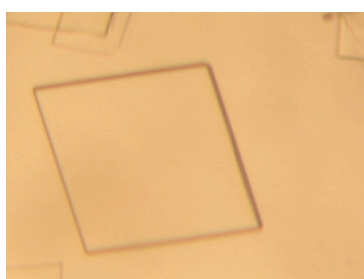
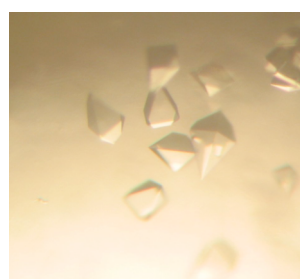


Figure 80 : Diagramme de phase d'une protéine.



1,5 M lithium sulfate
0,1 M HEPES pH 7.5
AAC(6')-Ib₁₁ 20 mg/mL



1,5 M K₂HPO₄
0,06 M NaH₂PO₄
0,1 M guanidine
AAC(6')-Ib 20 mg/mL

Figure 81 : Conditions de cristallisation de l'AAC(6')-Ib et de l'AAC(6')-Ib₁₁ ayant permis d'enregistrer des collectes de données au synchrotron.

2) Cryocristallographie

Afin de limiter les dommages dus à l'irradiation des cristaux par les rayons X, la collecte des données de diffraction s'effectue à très basse température sous un flux d'azote gazeux à 100 K. Les cristaux sont préalablement congelés rapidement dans l'azote liquide. Cependant, l'eau contenue dans les cristaux se congèle également et forme de la glace pouvant endommager le cristal et perturber l'interprétation des clichés de diffraction par la présence d'anneaux de glace. Pour remédier à ce problème, les cristaux sont trempés dans une solution cryoprotectante avant d'être congelés. Les cryoprotectants les plus utilisés sont

le glycerol, le MPD, l'éthylène glycol et les PEG de faibles poids moléculaires (PEG 200, PEG 400). Dans cette étude, les cristaux de protéine native ont été cryoprotégés en présence de 15 % de glycerol. Les cristaux de l'enzyme mutante Ib₁₁ n'ont pas été cryoprotégés. En effet, l'ajout de cryoprotectant limitait le pouvoir diffractant des cristaux et les anneaux de glace observés étaient de faible intensité.

3) Principe de la diffraction

Pour qu'un objet diffracte une onde, la longueur d'onde incidente doit être de l'ordre de grandeur de l'objet étudié. Pour observer une macromolécule à la résolution atomique, il faut donc utilisé les rayons X dont les longueurs d'onde s'étendent de 0.1 à 3 Å.

Il existe plusieurs sources de rayons X. Dans cette étude les données de diffraction ont été obtenues à partir d'une source synchrotron (ESRF Grenoble, lignes FIP et ID14). Le rayonnement synchrotron présente en effet plusieurs avantages :

- la brillance spectrale du faisceau est très élevée ce qui permet de réduire le temps d'exposition ;
- la géométrie du faisceau permet une meilleure résolution spatiale des taches de diffraction ;
- le rapport signal sur bruit est amélioré ce qui permet un gain en résolution ;
- la longueur d'onde ajustable permet d'utiliser la diffusion anormale de certains éléments.

L'interaction d'un faisceau de rayons X avec un objet va générer un phénomène de diffusion, c'est à dire l'émission de rayons X de façon continue dans toutes les directions de l'espace. Dans le cas d'une macromolécule isolée, le signal émis est trop faible pour être détecté, car la majorité des rayons vont la traverser sans être diffractés. Un cristal étant constitué d'un très grand nombre de molécules identiques (de l'ordre de 10^{15}) disposées périodiquement, le signal sera échantillonné selon un réseau périodique et amplifié proportionnellement au nombre de molécules identiques.

L'objet (le cristal) peut être représenté comme le produit de convolution d'un motif (la macromolécule) par un réseau (caractérisé par la maille et le groupe d'espace du cristal). Le motif est répété à chaque nœud du réseau suivant les symétries du groupe d'espace. Le cliché de diffraction est la transformée de Fourier (selon la convention des cristallographes) de la densité électronique de l'objet et est donc le produit des tranformés de Fourier du motif par celle du réseau. La transformée de Fourier du réseau est un réseau, le reseau

réciroque. Le cliché de diffraction représente donc la transformée de Fourier de la densité électronique échantillonnée aux nœuds du réseau réciroque.

$$\rho(xyz) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i (hx+ky+lz)}$$

L'équation précédente établit la relation entre le facteur de structure F_{hkl} et la densité électronique ρ . V est le volume de la maille cristalline, x, y, z , sont les coordonnées dans l'espace direct et h, k, l , les indices du réseau réciroque. F_{hkl} est décrit par son module $|F_{hkl}|$ et sa phase φ_{hkl} :

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\varphi_{hkl}}$$

L'intensité mesurée I_{hkl} d'un rayon diffracté, obtenue après intégration des données, est proportionnelle au carré de l'amplitude du facteur de structure $|F_{hkl}|^2$.

Lorsque le cristal est soumis à un faisceau de rayons X, la famille de plans réticulaires d'indices de Miller (hkl) donne lieu à un faisceau diffracté si et seulement si la loi de Bragg est respectée :

$$2d_{hkl} \sin(\theta) = n\lambda$$

où d_{hkl} est la distance inter réticulaire de la famille de plans (hkl), θ l'angle entre la direction du faisceau incident de longueur d'onde λ et la famille de plans réticulaires. L'enregistrement d'un espace complet de diffraction nécessite de mesurer l'intensité d'un maximum d'ondes diffractées en tenant compte de la symétrie cristallographique. Le principe le plus couramment utilisé consiste à travailler en lumière monochromatique (λ constant), et à imposer un mouvement de rotation au cristal pour faire varier l'angle θ .

4) Traitement des données

a) Principe

Le traitement des données a été effectué avec les programmes XDS (Kabsch 1993) et MOSFLM (Powell 1999). Lors de l'enregistrement des clichés de diffraction d'un cristal nous observons sur le détecteur des taches de diffraction : il s'agit des pixels du détecteur qui ont été excités par les rayons diffractés. Le nombre de photons reçus par l'ensemble des pixels formant la tache permet de déterminer l'intensité de cette dernière. La première étape du traitement des clichés de diffraction consiste à déterminer les paramètres de la maille

cristalline et le groupe d'espace. Des pics correspondant aux taches de diffraction sont mesurés sur une ou plusieurs images. Une liste de vecteurs entre pics est ensuite écrite permettant d'aboutir à l'estimation du réseau direct et du groupe d'espace. Par la suite, les données sont indexées image par image, en affinant un certain nombre de paramètres comme la distance cristal-détecteur, la position du centre du détecteur, l'orientation du cristal, les paramètres de maille, etc. Les profils de diffraction prédits sont ajustés aux taches observées. Chaque tache est alors indexée en h , k et l . Dans le même temps l'intensité de chaque tache de diffraction est mesurée en corrigeant le bruit de fond.

Enfin, la dernière étape du traitement consiste en la mise à l'échelle et à la réduction du jeu de données. Pour la mise à l'échelle, les données sont moyennées sur les réflexions équivalentes. Ces données moyennées peuvent alors être réduites à l'unité asymétrique. Cette dernière étape (mise à l'échelle et réduction) a été effectuée avec la suite de programmes CCP4 (*Collaborative Computational Project, Number 4, 1994*) SCALA et TRUNCATE.

b) Evaluation

Plusieurs critères permettent d'évaluer la qualité du jeu de données :

- La valeur du facteur R_{sym}

Le R_{sym} est un facteur d'accord entre les intensités équivalentes par symétrie, il donne une estimation de l'erreur relative des mesures d'intensité.

$$R_{\text{sym}} = (\sum_{hkl} |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle|) / (\sum_{hkl} \langle I_{hkl} \rangle)$$

Où I_{hkl} est l'intensité d'une réflexion d'indices hkl corrigée et mise à l'échelle et $\langle I_{hkl} \rangle$ est la moyenne de l'ensemble des intensités équivalentes. En général, les valeurs de R_{sym} acceptables sont comprises entre 4 et 15 % ;

- La complétude

La complétude des données est une mesure du nombre de réflexions uniques observées par rapport au nombre de réflexions uniques théoriquement mesurables. Elle est fonction du groupe d'espace, des paramètres de maille et de la résolution. La complétude doit être la plus proche de 100% ;

- La redondance

La redondance traduit le nombre de fois qu'une réflexion unique a été mesurée. Plus une réflexion est mesurée un grand nombre de fois, meilleure sera l'estimation de son intensité moyenne I , plus petite sera celle de son écart type $\sigma(I)$ et donc meilleure sera la qualité du jeu de donnée ;

- Le rapport signal sur bruit : $I/\sigma(I)$

Plus le signal est élevée par rapport au bruit de fond, meilleures sont les estimations des intensités et donc des facteurs de structure. Ce facteur rend compte de la précision des mesures et permet de déterminer le seuil de coupure en résolution d'un jeu de données.

c) Détermination des symétries non-cristallographiques

Si le cristal contient plusieurs molécules dans l'unité asymétrique, celles-ci peuvent être reliées par des symétries non-cristallographiques. La recherche des axes non-cristallographiques se fait par une fonction d'auto-rotation qui est une fonction d'auto-corrélation dans l'espace de Patterson. La fonction de Patterson consiste en un produit de convolution de la densité électronique avec sa symétrique par rapport à l'origine. Pratiquement, elle se calcule comme une synthèse de Fourier avec les intensités diffractées.

Les cartes de Patterson contiennent alors des pics correspondant à tous les vecteurs interatomiques. Dans la fonction d'auto-rotation, la carte de Patterson native est superposée à elle-même. Si après une rotation ne correspondant pas à une rotation cristallographique, la corrélation est forte, cela met en évidence que cette rotation met en relation des molécules de l'unité asymétrique.

5) Détermination des structures

Le problème majeur de la cristallographie des macromolécules tient dans la perte d'information des phases des ondes diffractées. Seules les intensités des faisceaux diffractés sont enregistrées et l'information de déphasage des ondes les unes par rapport aux autres est perdue. La levée de l'indétermination des phases peut être résolue par quatre techniques :

- Le remplacement moléculaire
- La diffusion anormale
- Le remplacement isomorphe
- Les méthodes directes

Seules les techniques de remplacement moléculaire et de diffusion anormale à plusieurs longueurs d'onde (MAD, *Multiple Anomalous Diffusion*), utilisées dans cette étude, seront décrites ici.

a) MAD

- *La diffusion anormale*

Le phénomène de diffusion anormale est dû au fait que le facteur de diffusion atomique (f) d'un atome varie fortement, en module et en phase, dans la région du seuil d'absorption de l'atome. Dans les conditions dites « normales », c'est à dire lorsque la longueur d'onde incidente est loin du seuil d'absorption d'un atome, il n'y a pas de différence de phase entre l'onde diffusée par cet atome et celle diffusée par un électron. Le rayonnement incident n'est pas absorbé car il ne possède pas assez d'énergie pour exciter les électrons. Un atome j se caractérise alors par un nombre réel, son facteur de diffusion f_j , qui est corrélé au nombre d'électrons qui lui est associé. Dans ces conditions, la loi de Friedel, qui rend compte de l'égalité des amplitudes de réflexions (hkl) et $(-h-k-l)$, est respectée :

$$|F(hkl)| = |F(-h-k-l)| \text{ et } \varphi_{hkl} = -\varphi_{-h-k-l}$$

La loi de Friedel n'est plus respectée lorsque la longueur d'onde incidente est proche du seuil d'absorption d'un atome. Il y a alors absorption du rayonnement incident par les électrons des couches inférieures qui sont excités vers des états d'énergie plus élevés. Il en résulte un changement de phase entre le rayonnement incident et le rayonnement diffracté (phénomène de résonance).

Le facteur de diffusion f est alors représenté par un nombre complexe qui dépend de la longueur d'onde λ du rayon incident :

$$f_j = f^0 + f'(\lambda) + i f''(\lambda)$$

Où f' est la composante anormale sur l'axe réel et f'' la composante anormale sur l'axe imaginaire (déphasage de $\pi/2$) (figure 82).

Cet effet est fonction de la longueur d'onde incidente et de la nature de l'atome j . Il est plus important pour les atomes de numéro atomique élevé, dits atomes lourds (comme le sélénium qui possède 34 e^-) que pour les atomes dits légers (majorité des atomes constituant les protéines, C, N, O entre 6 et 8 e^-).

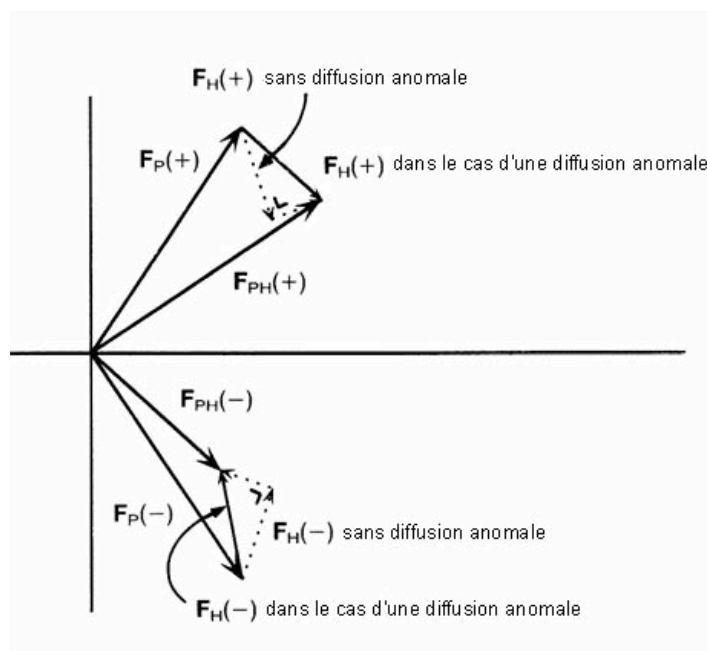


Figure 82 : Non-respect de la loi de Friedel due à la diffusion anormale. P désigne la contribution des atomes qui diffractent « normalement » et H celle des atomes anormaux. $F_P(+)$ et $F_P(-)$ sont symétriques par rapport à l'axe horizontal (pas de diffuseur anormal dans la protéine). En l'absence de diffusion anormale, $F_H(+)$ et $F_H(-)$ sont également symétriques. Dans le cas d'une diffusion anormale, la contribution imaginaire implique le non-respect de la loi de Friedel, ici $|F_{PH}(+)| > |F_{PH}(-)|$.

Le non respect de la loi de Friedel permet d'introduire une information supplémentaire pour le phasage : si le dérivé lourd présente de la diffusion anormale, F_{PH}^+ sera distinct de F_{PH}^- . L'information anormale permet donc de calculer les phases.

- Le MAD

La détermination des phases par la méthode MAD repose sur l'enregistrement de données de diffraction à trois longueurs d'onde correspondant au maximum de f'' , au minimum de f' et à une longueur d'onde loin du seuil d'absorption.

La première étape pour la résolution des phases par MAD est la localisation des atomes lourds. Celle-ci est réalisée via le calcul d'une fonction de Patterson anormale, $P_{\text{ano}}(uvw)$, qui représente les vecteurs inter-atomiques des atomes lourds :

$$P_{\text{ano}}(uvw) = \sum_{hkl} (\Delta|F|_{\text{ano}})^2 \cos [2\pi (hu + kv + lw)]$$

$$\Delta D_{\text{ano}} = |F_{\text{PH}}(+)| - |F_{\text{PH}}(-)|$$

La fonction de Patterson anormale, $P_{\text{ano}}(uvw)$, mime une fonction de Patterson dont les coefficients sont les carrés des modules de la contribution des atomes anomaux aux facteurs de structure. Les pics de la carte de Patterson anormale correspondent aux extrémités des vecteurs interatomiques des diffuseurs anomaux. Les éléments de symétrie, imposés par le groupe d'espace, engendrent des concentrations élevées de pics dans les sections de Harker. Un pic important révèle la présence d'au moins un site de fixation d'un atome anormal. La déconvolution de la fonction de Patterson permet donc de déterminer la position des atomes anomaux dans la maille.

Dans cette étude, nous avons utilisé le sélénium comme diffuseur anormal. Certains diffuseurs anomaux sont incorporés dans les cristaux par trempage ; dans le cas du sélénium, la culture bactérienne est réalisée en présence de sélénium. Celui-ci est alors bio-incorporé dans la protéine sous forme de séléno-méthionine. Dans le cas de l'AAC(6')-Ib, la présence de sélénium n'a pas modifié les conditions de cristallisation et n'a pas affecté le pouvoir diffractant des cristaux. Les valeurs de f' et f'' ont été déterminées au préalable à partir d'un spectre de fluorescence. Après traitement des trois jeux de données dans XDS, le phasage a été réalisé avec le programme SHARP.

b) Remplacement moléculaire

La technique du remplacement moléculaire nécessite que la structure d'une macromolécule présentant une séquence primaire homologe à celle de la macromolécule étudiée, ait été résolue. Cette méthode repose sur l'observation que des protéines

partageant un taux d'identité de séquence primaire de plus de 20-25 % présentent des structures similaires.

L'objectif est de placer le modèle (macromolécule de structure connue) dans la maille cristalline de la protéine de structure inconnue. Le problème à six paramètres (3 angles d'orientation et 3 vecteurs de position) peut être décomposé en deux recherches successives à 3 paramètres. Le modèle est d'abord orienté dans la maille par une fonction de rotation puis il est positionné dans la maille par une fonction de translation.

La qualité des solutions est estimée par la valeur du facteur R cristallographique :

$$R = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)| - |F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|}$$

Dans ce travail, le remplacement moléculaire a été tenté pour résoudre le problème des phases dans le cas de l'AAC(6')-Ib₁₁. Le maximum d'identité de séquence avec des protéines de structures connues était de 23 %. Cependant cette technique n'a pas donné de solutions. La comparaison de notre structure, finalement résolue par MAD, avec les modèles utilisés pour le remplacement moléculaire, met en évidence des régions très différentes qui expliqueraient l'échec de cette méthode. Par la suite, nous avons utilisé le programme PHASER (Read 2001) de remplacement moléculaire pour résoudre la structure de l'AAC(6')-Ib à partir de la structure de l'AAC(6')-Ib₁₁.

6) Affinement

L'affinement est un processus itératif alternant la construction du modèle dans l'espace réel, construction manuelle (ici via les programmes O (Jones *et al.* 1991) ou Coot (Emsley et Cowtan 2004)) ou automatique (ARP/wARP (Perrakis *et al.* 1999)), et l'affinement dans l'espace réciproque (programmes CNS (Brunger *et al.* 1998) ou Refmac (Winn *et al.* 2001)).

Le modèle construit dans la carte de densité électronique, même s'il est proche de la structure réelle, ne rend pas bien compte des données expérimentales. L'affinement cristallographique vise donc à réduire l'écart entre les facteurs de structure observés et calculés en affinant les paramètres du modèle. Le facteur de structure F_{calc} est calculé par transformé de Fourier à partir du modèle atomique. Une grandeur indicatrice de l'état de l'affinement est le facteur R cristallographique explicité plus haut.

Du fait du grand nombre de paramètres à affiner, l'affinement est une étape qui est limitée d'une part par les capacités de calcul des ordinateurs et d'autre part par le rapport du nombre d'observations sur le nombre de paramètres. L'affinement n'est possible, et ne converge de manière satisfaisante, que si le nombre d'observations est supérieur au nombre de paramètres. Les paramètres sont en général au nombre de 4 par atome (x,y,z,B). Afin de contourner le problème du manque d'observations par rapport au nombre de paramètres, des restrictions sont apportées à partir des valeurs stéréochimiques standards, déterminées pour de petites molécules. Ces restrictions portent sur les longueurs et angles des liaisons covalentes, les angles dièdres des liaisons peptiques, les angles de torsions ...

Il faut également avoir des critères objectifs pour suivre l'affinement. Le facteur R n'est pas très objectif puisqu'il fait partie de la fonction à minimiser et que la modification des paramètres durant l'affinement va directement influencer sa valeur. En revanche, l'utilisation du facteur R_{libre} (R_{free}), calculé sur un jeu de réflexion exclues de l'affinement, permet d'avoir une estimation objective du protocole d'affinement puisque ce critère n'est pas basé directement sur les paramètres affinés. Les F_{calc} sont calculés globalement à partir du modèle, et sont comparés aux F_{obs} servant à l'affinement (R) et aux F_{obs} exclus (R_{libre}) une amélioration globale du modèle diminuera donc la valeur du facteur R_{libre} . Une diminution du R sans diminution du R_{libre} est le signe d'une modélisation de bruit à la place de l'amélioration du modèle. La diminution concomitante du R et du R_{libre} valide donc le protocole d'affinement. D'autre part, la stéréochimie de la macromolécule sera également un critère validant la qualité de l'affinement.

PUBLICATIONS

Available online at www.sciencedirect.com

C. R. Chimie 9 (2006) 413–419

<http://france.elsevier.com/direct/CRAS2C/>

NMR identification of ligands of aminoglycoside resistance enzymes

Frédérique Maurice ^a, Guillaume Bégis ^b, Laurent Micouin ^b, Frédéric Dardel ^{a,*}^a *Laboratoire de cristallographie et RMN biologiques, UMR 8015 CNRS, faculté de pharmacie,
4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris cedex 6, France*^b *Laboratoire de chimie thérapeutique, UMR 8638 CNRS, faculté de pharmacie,
4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris cedex 6, France*

Received 15 March 2005; accepted 6 June 2005

Available online 18 August 2005

Abstract

Bacterial resistance to aminoglycosides is mainly the result of enzyme-catalyzed chemical modifications of these antibiotics, which prevents their binding to their target. In order to circumvent this mechanism, an attractive possibility would be to block these enzymes, using selective inhibitors. This work describes a rational strategy aimed at isolating specific ligands of these enzymes, using NMR spectroscopy. Using magnetization transfer techniques, the identification of contacts between elementary pharmacophores and the protein target allows the guidance of hit improvement from a very early stage. *To cite this article: F. Maurice et al., C. R. Chimie 9 (2006).*

© 2005 Académie des sciences. Published by Elsevier SAS. All rights reserved.

Résumé

La résistance bactérienne aux aminoglycosides est principalement la conséquence de l'action d'enzymes qui modifient chimiquement ces antibiotiques et les empêchent ainsi de se lier à leur cible. Pour contourner ce mécanisme, une possibilité intéressante consisterait à bloquer l'action de ces enzymes au moyen d'inhibiteurs sélectifs. Nous décrivons une approche rationnelle utilisant la spectroscopie RMN pour isoler des ligands spécifiques de ces enzymes. En utilisant des techniques de transfert d'aimantation, l'identification de contacts entre des pharmacophores élémentaires et la cible protéique permet de guider de manière précoce le processus d'amélioration des touches obtenues. *Pour citer cet article : F. Maurice et al., C. R. Chimie 9 (2006).*

© 2005 Académie des sciences. Published by Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Flow-injection NMR; Screening; Antibiotic; Deoxystreptamine; Fluorescence

Mots clés : RMN en flux ; Criblage ; Antibiotique ; Désoxystreptamine ; Fluorescence

* Corresponding author.

E-mail address: frederic.dardel@univ-paris5.fr (F. Dardel).

1. Introduction

Aminoglycosides are broad-spectrum antibiotics which act by binding to the decoding site of ribosomal 16S RNA [1,2], they are used with β -lactams in polytherapies against severe infections caused by gram-negative bacteria and staphylococci, mostly of nosocomial origin. Resistance to these antibiotics arise mainly through the action of aminoglycoside-modifying enzymes which catalyze the covalent addition of acetyl, phosphate or nucleotidyl groups onto amino or hydroxyl functions [3]. Among the modifying enzymes found in clinical strains, *N*-6' aminoglycoside acetyl transferases (AAC(6')) are the most prevalent ones, accounting for 50–75% of the resistance phenotypes (their mechanism is shown in Fig. 1A). These have been classified in subfamilies (AAC(6')-I, AAC(6')-II, AAC(6')-III and AAC(6')-IV, see [2]), based on their specificity profile vs. the various clinically used aminoglycosides (Gentamicin, Amikacin, Isepamicin...). This picture has recently been getting more complicated, as very broad-spectrum variants have begun to emerge [4], which confer resistance to almost all aminoglycosides and are thus a serious threat to current therapies.

In order to circumvent this problem, it would be desirable to either isolate new aminoglycosides, which escape the current resistance mechanisms or to design specific inhibitors of their modifying enzymes. Up to now, however, progress in these two directions has been hampered by the difficulties of aminoglycoside chemistry. These result from the combination of two factors: the large number of functional groups and chiral centers in these molecules and their intrinsic symmetry (see for instance kanamycin, Fig. 1B) and in particular that of the central ring, 2-deoxystreptamine (2-DOS), a *meso* compound. Synthetic routes to this compound are known but are still quite involved (reviewed in [5]) and attempts to replace it with alternate, simpler scaffolds have so far only been moderately successful [6]. There is thus a need for an efficient 2-DOS mimic, as a building block for aminoglycoside resistance enzyme inhibitors. The present work describes the identification of such a compound and of an NMR-based strategy to characterize derivatives of this molecule with improved affinities to one of the new extended-spectrum, clinical forms of AAC(6'), AA(6')-Ib₁₁ [4].

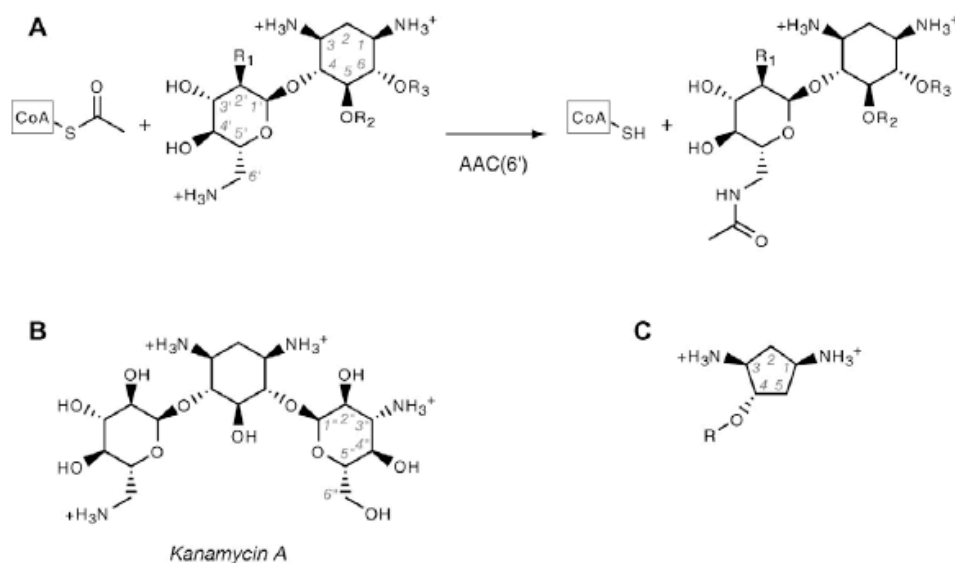


Fig. 1. (A) Aminoglycoside acetylation reaction catalysed by AAC(6') enzymes. Shown is the common core structure, which corresponds to neamine. Amines are shown in protonated form, as they usually are at physiological pH. CoA stands for Coenzyme A. R₁ is either –OH or –NH₂. Aminoglycosides are either substituted at R₂ or R₃, yielding the neomycin and kanamycin family, respectively. (B) Structure of kanamycin A, showing the quasi-symmetry about the median plane of deoxystreptamine ring. (C) Generic structure of the deoxystreptamine analogues used in this study.

2. Materials and methods

2.1. Enzyme expression and purification

The enzyme used in this study is an extended-spectrum aminoglycoside 6' *N*-acetyl transferase of type Ib isolated from a clinical *Salmonella* strain [4]. A recombinant expression system was constructed by cloning the PCR-amplified DNA coding sequence in plasmid pET101, using the pET101/D-Topo expression kit (Invitrogen). The resulting recombinant plasmid encodes the 189 aminoacid subunit of AAC(6')-1b₁₁ [4] under control of the T7 transcription promoter. Expression of the protein was obtained after transformation of the plasmid into strain BL21Star (Invitrogen). Cells were grown at 37 °C in LB medium supplemented with ampicillin (100 mg/l) until turbidity reached an absorbance of 1.0 at 650 nm. They were then induced by addition of 0.5 mM isopropylthiogalactoside (IPTG), incubation was then continued for 2 h at 30 °C. Bacteria were harvested by centrifugation, resuspended in 20 mM sodium phosphate pH 7.5 (buffer A) and lysed by sonication. Cell debris were removed by centrifugation and the crude extract was loaded on a Superdex G75 gel filtration column (2.6 × 60 cm, Amersham) equilibrated in buffer A. Fractions containing the overproduced enzyme were pooled and submitted to an ion-exchange chromatographic step: after loading on a Q-Sepharose Hiload column (2.6 × 20 cm, Amersham) equilibrated in buffer A, the protein was eluted by applying a 0–500-mM linear NaCl gradient. The pooled protein fractions were dialyzed against 20 mM Tris–HCl pH 8.5 and submitted to a second ion-exchange chromatographic step in this buffer. Except for the increased pH, it was identical to the first ion-exchange separation. After this step, the protein was homogeneous, as judged by SDS-gel electrophoresis. It was dialyzed against 10 mM HEPES pH 7.0 and concentrated by ultrafiltration on a Centriprep cell (Amicon-Millipore). Yield was 7.5 mg of purified enzyme for a 1 l of culture.

2.2. Ligands

Kanamycin A sulfate was from Amersham-USB. Synthesis of compound 1 has been described [7], and that of 2 and 3 will be described elsewhere (Begis & Micouin, unpublished). Concentrated stock solutions

(50 mM) were prepared in H₂O from dry chlorhydrates (compounds 1, 2 and 3) or sulfate (Kanamycin) and the pH was adjusted to neutrality.

2.3. NMR methods

Spectra were recorded on a 600-MHz Bruker Avance spectrometer equipped with either a 5-mm standard triple resonance inverse probe, or with a 3-mm triple resonance flow-injection probe connected to a LC215 Gilson pipetting robot (Bruker BEST system). All spectra were recorded in 20-mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) prepared in 90% H₂O/10% ²H₂O (by volume) and the solvent resonance was suppressed by presaturation, excitation sculpting [8] or by gradient selection for heteronuclear experiments. Resonance assignments for kanamycin were obtained using a 50-mM sample in a 5-mm tube. 2D ROESY, DQF-COSY and [¹H–¹³C] HSQC as well as a natural abundance 3D [¹H–¹³C] TOCSY–HSQC were recorded. The latter experiment was required to unambiguously assign the severely overlapping sugar proton massif. All experiments were recorded at 25 °C (298 K). Stereoselective assignments of the methylene protons of carbon 2 of both kanamycin and compound 1 were obtained by analyzing the relative intensity of the ROESY transfers and *J*-couplings with protons 1 and 3 (numbering as in Fig. 1). Assignments are indicated on Fig. 2. Ligand binding was monitored by the Saturation Transfer Difference (STD) [9] and/or the reverse NOE pumping methods [10], using the flow-injection NMR system. Sample injection was as previously described [11], briefly, the ligand and the protein were mixed in a final volume of 180 µl of 20-mM sodium phosphate pH 7.0 and put in 96-well plates. Final concentrations were 1 mM for the ligand and 50 µM for the protein. For STD experiments, band irradiation of the protein methyl massif (0.5 ppm) was performed for 2 s at field strength of 80–100 Hz. For reverse NOE pumping, mixing times of 200 and 700 ms were used, in order to detect both strong and weak transfers.

2.4. Biochemical affinity measurements

Fluorescence measurements were performed in a Jasco FP6200 spectrophotofluorimeter equipped with a thermostated cell. The enzyme concentration was 80 nM in 1 ml of 20 mM sodium phosphate buffer pH

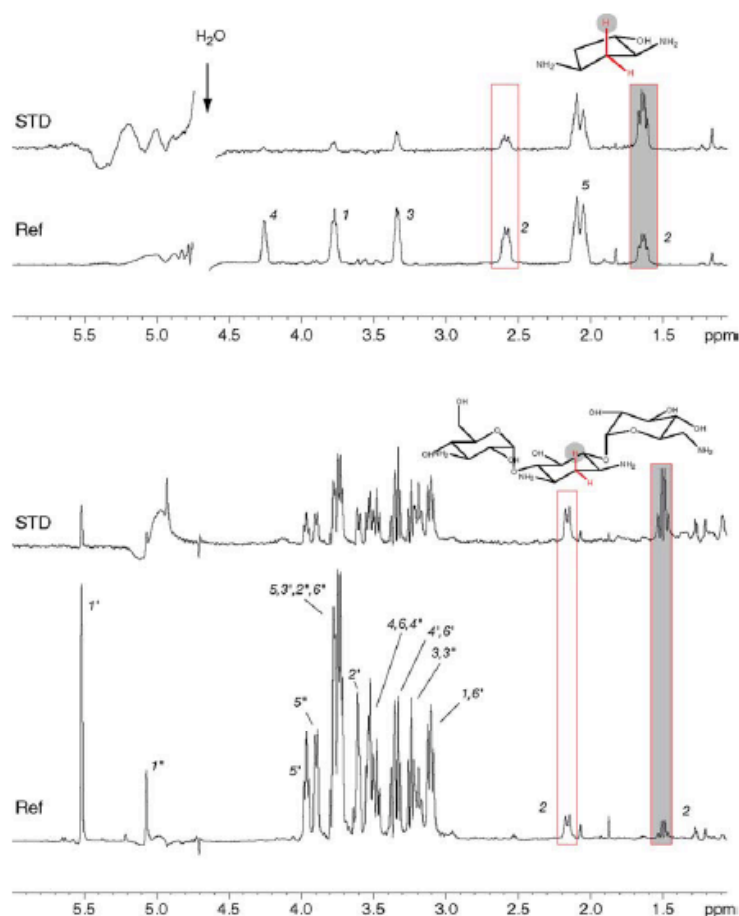


Fig. 2. STD analysis [9] of the binding of kanamycin (bottom) and the deoxystreptamine analogue 1 (top) to AAC(6')-Ib₁₁. Assignments of the various protons are indicated on the reference spectra (Ref). The boxed peaks correspond to protons of the CH₂ group located in between the two amino groups. In both cases, the shaded box corresponds to the axial proton of this methylene group and shows the strongest STD signal.

7.5. Increasing amounts of the ligands were iteratively added to the protein solution, which was magnetically stirred. The intrinsic fluorescence of tryptophan residues was followed using an excitation wavelength of either 280 or 295 nm and an emission wavelength of 343 nm. All measurements were performed at 21 °C. All points were measured in duplicate and the binding parameters were derived by iterative non-linear least square fitting to a single hyperbolic function [12]. Additional binding data were also obtained by equilibrium dialysis, using disposable microcells (DispoEquilibrium Dialyzer, Harvard Biosciences, Hollington, USA). The enzyme compartment (75 µl) contained 200 µM of purified AAC(6')-Ib and the ligand compartment (75 µl) contained an equal concentration of compound 2, either

with or without 200 µM of kanamycin A. After equilibration, relative ligand concentrations in the equilibrium dialysis cell compartments were monitored by UV spectrophotometry. Dissociation constants were estimated with Mathematica (Wolfram Research).

3. Results

3.1. Design of an analogue of 2-deoxystreptamine

The common core structure recognized by *N*-6' aminoglycoside acetyl transferases corresponds approximately to that of neamine (Fig. 1A), i.e. a 6-glucosamine attached to a 2-deoxystreptamine ring (2-DOS). Sub-

stituents attached to positions 5 and 6 (R1 and R2, Fig. 1A) appear not to be involved in interactions with these enzymes. This is confirmed by the crystal structure of AAC(6')-Iy complexed with ribostamycin [13] for which the R2 group is a ribose, which lies in the solvent, making little if any contacts with the protein. This is in contrast with the 2-DOS ring, which makes electrostatic interactions with the enzyme via its two amino groups and is stacked on aromatic side chains. Thus, any scheme for designing an inhibitor of AAC(6') must include 2-DOS or a structural analogue of it. However, 2-DOS chemistry is quite difficult, making its direct use a serious challenge and we thus chose to try and replace it by similar, more accessible scaffold. The features which we found desirable for an analogue of 2-DOS in the context of AAC(6') inhibition were: (i) a constrained cyclic structure which would allow stacking within the enzyme active site, (ii) a pair of amino groups with a geometry close to that of 2-DOS, and (iii) an additional function for linking 6-glucosamine or a similar group in an analogous geometry. We selected derivatives of *trans, trans* diamino-cyclopentanol (Fig. 1C and Fig. 3) as these fulfilled the three above criteria, have no additional reactive groups apart from those strictly necessary, are no longer symmetrical and can be easily synthesized enantioselectively [7].

3.2. diamino-cyclopentanol binding to AAC(6')-Ib

The binding of diamino-cyclopentanol (compound 1, Fig. 3) to AAC(6')-Ib was analyzed and compared to that of kanamycin A, a natural substrate of the enzyme. As it is a very simple pharmacophore, one could expect it to have a significantly reduced affinity. We thus used NMR interaction screening, as this technique is able to detect weak interactions and provides information on the binding mode of the ligand. Both STD and reverse NOE pumping experiments were used to evidence mag-

netization transfer between the protein and specific protons from the ligand. Similar results were obtained with both techniques and a typical STD experiment is shown in Fig. 2. Two pieces of information can be derived from these approaches: observation of transferred magnetization demonstrates that compound 1 binds efficiently to the enzyme. For both STD (Fig. 2) and NOE pumping (not shown), a significantly stronger signal is observed for the axial proton located on carbon 2 (Fig. 2, numbering as in Fig. 1). This indicates that kanamycin binds the enzyme with the amino face of 2-DOS in close contact with AAC(6')-Ib, a result which is in keeping with the crystal structure of the distantly related AAC(6')-Iy [13], and that compound 1 binds in a similar fashion, also with the two amino groups facing the enzyme surface. Equilibrium dialysis experiments confirmed that diamino-cyclopentanol derivatives such as compound 2 do bind to AAC(6')-Ib, with a K_d in the 10^{-5} M range, and that this interaction is efficiently antagonized by kanamycin (not shown) and thus that binding is competitive. This experiment was performed with compound 2, as its concentration can be easily monitored by UV absorption. Overall, this strongly suggests that binding of diamino-cyclopentanol and its derivatives occurs at the same site and in the same orientation as that of 2-DOS in kanamycin.

3.3. NMR provides qualitative information on AAC(6') ligand affinity

The above results show that compound 1 is indeed a simple scaffold that can mimic 2-deoxystreptamine in the design of competitive inhibitors of AAC(6') enzymes. Because of its small size, its binding affinity, is however, limited and it failed to significantly inhibit the enzyme in standard acetylation assays (not shown). Nevertheless, it provides a specific anchor point on the enzyme, from which more complex molecules can be constructed, by

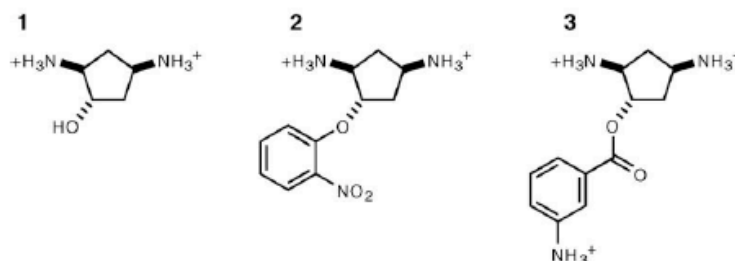


Fig. 3. Structure of the AAC(6') ligands used in this study. These were racemic mixtures of the two possible enantiomers.

linking additional pharmacophores to improve the affinity. Several derivatives of compound **1** were thus synthesized by substituting the hydroxyl group with different types of linkages. Two such compounds with aryl groups replacing the 6-glucosamine groups are shown in Fig. 3. Because of the lack of an efficient enzymatic test at this early stage of inhibitor design, we wanted to investigate whether NMR interaction screening techniques such as reverse NOE pumping could provide qualitative information on the binding mode and affinity of these bipartite ligands of AAC(6'). We chose compounds **2** and **3** (Fig. 3) since their NMR spectra show completely separate signals for the cyclopentane moiety and the aromatic ring, on either side of the spectral window (Fig. 4). It was expected that for all such ligands, the constant cyclopentane ring would bind in most cases, whereas, depending on the nature of the linkage and of the substituent, the other moiety would either fit into the active site or be rejected outside the protein. In the former case, NOE transfer is expected to occur for both parts of the molecule, whereas in the latter, transfer would only occur for the cyclopentane moiety, and not for the substituent. The

result of such an experiment for compounds **2** and **3** is shown in Fig. 4. Compound **2** does show a contact between an aromatic proton and the protein (emphasized by a black circle on Fig. 4), whereas compound **3** does not show any significant transfer. This suggests that the aromatic ring of compound **2** slips at least in part into the active site, whereas that of compound **3** cannot, possibly because of the different linkage. In order to see whether these observations could be correlated with the affinity of these two ligands for the enzyme, fluorescence titration were performed. We indeed observed that ligand binding induces a large quenching of the intrinsic fluorescent signal of tryptophan residues (50–70% quenching). This was not unexpected as AAC(6')-I enzymes share conserved tryptophan residues within their active sites, on which the 2-DOS ring of the substrate was observed to stack [13]. The resulting fluorescence data were compared to that obtained with the parent compound **1**, in order to see whether the substituents provided either an improvement or a loss of affinity, and this is shown on Fig. 5. The three compounds indeed showed differential affinities, with calculated dissociation con-

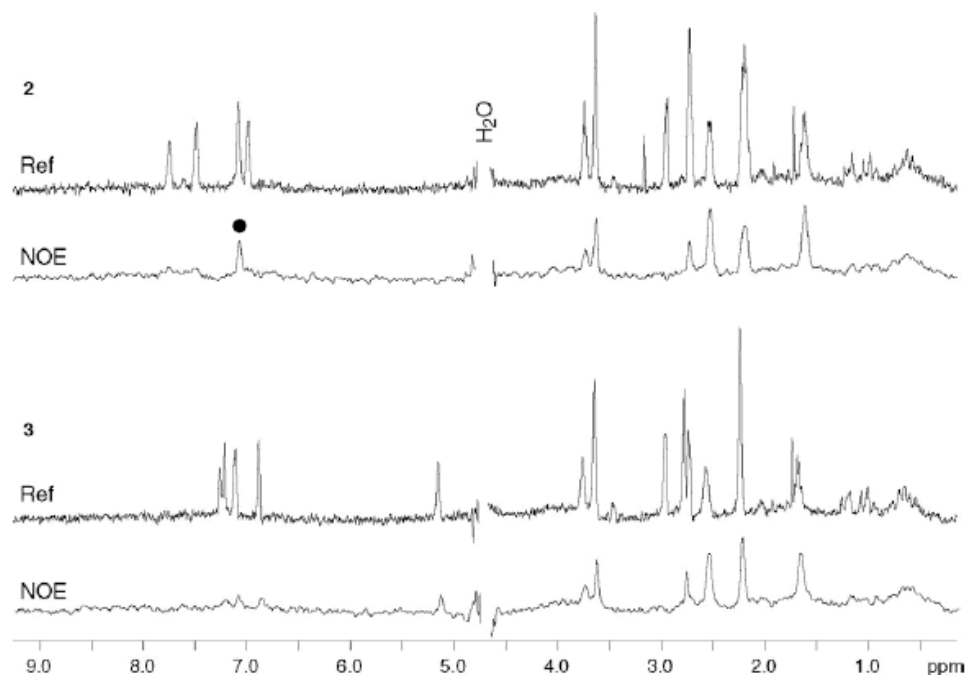


Fig. 4. Interaction of ligands **2** (top) and **3** (bottom) with AAC(6')-Ib₁₁. Shown are reference proton spectra (Ref) immediately above the corresponding reverse NOE pumping experiments (NOE), which show, the intermolecular NOE transfer between the ligands and the protein [10]. Aliphatic resonance (1.5–5.5 ppm) belongs to the cyclopentane ring, whereas the leftmost protons (6.5–8.0 ppm) correspond to the aromatic ring substituent.

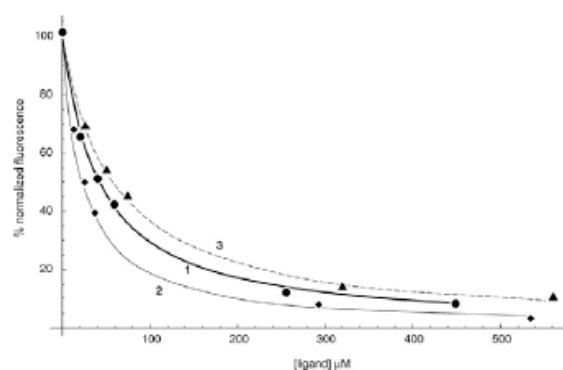


Fig. 5. Fluorescence titration of the binding of the various ligands to AAC(6')-Ib. The fluorescence data were normalized, so that the initial signal was set to 100% and the fully quenched signal extrapolated at infinite ligand concentration corresponded to 0%. Individual data points are shown on top of the fitted curves. The titration of the reference compound **1** is shown with solid circles and a thick line. Data corresponding to compounds **2** and **3** are indicated by diamonds and a thin line, or by triangles and a dashed line, respectively.

stants of $41 \pm 3 \mu\text{M}$ for compound **1**, $23 \pm 2 \mu\text{M}$ for compound **2** and $57 \pm 6 \mu\text{M}$ for compound **3**. This correlates very well with the NMR results, as the additional contact zone observed with **2** indeed results in a twofold improvement of the affinity, whereas the small loss observed with **3** can probably be ascribed to a steric hindrance of the substituent, which apparently does not fit into the protein.

4. Conclusion

This work describes an iterative strategy for designing ligands of AAC(6'), which can be used for isolating inhibitors of these antibiotic resistance enzymes. It is based on the characterization of a primary pharmacophore showing specific binding, the affinity of which is subsequently improved by 'decorating' it with additional functional groups. Both stages of this approach rely on the use of NMR to detect and characterize ligand interactions. In the first step, NMR was used to reveal weak but specific interactions of simple compounds, which cannot be reliably detected by enzymatic tests. It also allowed controlling that they were likely to bind in the correct orientation. In a latter stage, the present study shows that the NMR approach allows a qualitative ranking of the various substituents of the anchoring pharmacophore, diamino cyclopentanol. This can provide a rationale for the early guidance of medicinal chemists and thus could significantly speed up the discovery process. This is par-

ticularly interesting for those molecules, which cannot be easily tested by fluorimetric techniques. A number of the derivatives of compound **1**, which were originally synthesized indeed either showed a significant fluorescent background or exhibited a significant UV absorbance at the typical tryptophan excitation wavelengths, which prevented their direct analysis by fluorescence methods. Those molecules can, however, be productively tested by the NMR approach. Using the above strategy, ligands with affinities in the micromolar range have presently been isolated, and all of these derive from an original and easily accessible scaffold. This is already significant and further application of this strategy should in principle allow for the identification of inhibitors with higher affinities. Its combination with robotized flow-injection NMR makes it attractive for a medium scale screening approach of aminoglycoside resistance enzyme inhibitors.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Drs. E. Collatz and O. Pajot for gift of strains and plasmids. F. Maurice is recipient of a studentship from the French 'Ministère de la Recherche et de la Technologie'. Supported in part by an ACI 'Jeune Chercheur' to L. M.

References

- [1] G.D. Wright, A.M. Berghuis, S. Mobashery, *Adv. Exp. Med. Biol.* 456 (1998) 27.
- [2] M.-P. Mingot-Leclercq, Y. Glupczynski, P.M. Tulkens, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 727.
- [3] G.D. Wright, *Curr. Opin. Microbiol.* 2 (1999) 499.
- [4] I. Casin, B. Hanau-Bercot, I. Podglajen, H. Vahaboglu, E. Collatz, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 697.
- [5] G.F. Busscher, F.P. Rutjes, F.L. van Delft, *Chem. Rev.* 105 (2005) 775.
- [6] D. Vourloumis, G.C. Winters, M. Takahashi, K.B. Simonsen, B.K. Ayida, S. Shandrick, Q. Zhao, T. Hermann, *ChemBioChem* 4 (2003) 879.
- [7] A. Pérez-Luna, M.A. Ceschi, M. Bonin, L. Micouin, H.-P. Husson, S. Gougeon, G. Estenne-Bouthou, B. Marabout, M. Sevrin, P. George, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 3522.
- [8] T.S. Hwang, A.J. Shaka, *J. Magn. Reson. A* 112 (1995) 275.
- [9] M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 6108.
- [10] A. Chen, M.J. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 414.
- [11] C. Tisne, F. Dardel, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 5 (2002) 523.
- [12] F. Dardel, *Comput. Appl. Biosci.* 10 (1994) 273.
- [13] M.W. Vetting, S. Magnet, E. Nieves, S.L. Roderick, J.S. Blanchard, *Chem. Biol.* 11 (2004) 565.

Enzyme structure plasticity and emergence of broad spectrum antibiotic resistance

Frédérique Maurice¹, Isabelle Broutin¹, Isabelle Podglajen², Philippe Benas¹, Ekkehard Collatz², & Frédéric Dardel¹

¹Cristallographie & RMN Biologiques, Université Paris Descartes, CNRS, 4 avenue de l'Observatoire, 75006, Paris, France,

²Laboratoire de Recherche Moléculaire sur les Antibiotiques, Université Paris 6, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris, France

The emergence of multi-resistant pathogenic bacteria is a worldwide health issue. Recently, clinical variants of a single antibiotic-modifying acetyltransferase, AAC(6')-Ib, have appeared that confer extended resistance to most aminoglycosides and, more surprisingly, to structurally unrelated fluoroquinolones. The corresponding gene is carried by mobile genetic elements and is present in most multi-resistant pathogenic strains, hence making it a serious threat to current therapies. We report the crystal structures of both narrow and broad-spectrum resistance variants of this enzyme, which reveal the structural basis for the emergence of extended resistance. The active site displays an important plasticity and has adapted to new substrates by a large-scale gaping process. We have also obtained co-crystals with both substrates, as well as with a simple transition state analog, which provides new clues for the design of inhibitors of this resistance mechanism.

Keywords : acetyltransferase; aminoglycoside; antibiotic resistance; ciprofloxacin; crystallography

INTRODUCTION

One of the major mechanisms of antibiotic resistance is the enzymatic modification of the active compound which prevents its binding to the cellular target. Aminoglycosides and fluoroquinolones are potent, broad-spectrum antibiotics of major clinical importance. Until recently, they escaped this resistance mechanism to different degrees, which preserved them as key drugs for treating life-threatening infections caused by resistant bacteria. While no enzymatic modification of the synthetic fluoroquinolones had been observed, the known aminoglycoside-modifying enzymes with their somewhat limited substrate specificities could not simultaneously inactivate all clinically used compounds. One of the most common mechanisms is *N*-acetylation at the 6' position (Vakulenko & Mobashery, 2003) (Fig. 1A), catalyzed by the aminoglycoside 6'-*N*-acetyltransferases (AAC(6')). Two functional classes of this enzyme have been described: AAC(6')-I, conferring resistance to amikacin but not to gentamicin, and AAC(6')-II, with the reciprocal selectivity. Now, isoforms of the AAC(6')-Ib subclass have evolved in clinical isolates with the capacity to modify amikacin as well as gentamicin or some fluoroquinolones.

This has a strong clinical relevance, as AAC(6')-Ib is the most prevalent aminoglycoside-modifying enzyme, present in over 70% of AAC(6')-producing gram-negative isolates (Vakulenko & Mobashery, 2003). Its spread may have been favored by integration of its gene into natural expression vectors such as the integrons (Fluit & Schmitz, 2004). Among the recent variants of this enzyme with altered specificity are AAC(6')-Ib_u, which confers simultaneous resistance to gentamicin and amikacin (Casin *et al*, 2003) and AAC(6')-Ib-cr, which has a unique extension of its substrate specificity from aminoglycosides to structurally unrelated fluoroquinolones (Robicsek *et al*, 2006b). Both variants differ from the initially identified AAC(6')-Ib (Tran Van Nhieu & Collatz, 1987) (aside from functionally irrelevant *N*-terminal differences) by two amino acid substitutions each and are currently spreading (Robicsek *et al*, 2006a) (sequences in Supplementary Fig. 1).

Two structures of AAC(6')-I have been reported, AAC(6')-Ii and AAC(6')-Iy (Vetting *et al*, 2004; Wybenga-Groot *et al*, 1999). These two enzymes are chromosomally-encoded and hence confined to a single bacterial species. They confer a low level of resistance and their primary function as aminoglycoside resistance enzymes has been questioned (Magnet *et al*, 2001). Accordingly, they have moderate catalytic efficiencies and/or affinities for aminoglycosides, about one to two orders of magnitude lower than those of AAC(6')-Ib (Kim *et al*, 2007; Magnet *et al*, 2001; Wright & Ladak, 1997). Their sequences are also quite divergent from that of the predominant AAC(6')-Ib (identity level < 20%), therefore, they cannot be used to provide structural insights into the broadenings of AAC(6')-Ib specificity and its current clinical consequences.

In the present work, we report the structure of narrow and broad-spectrum variants of AAC(6')-Ib, free and complexed. Interaction with the antibiotic substrate is different from that of AAC(6')-Iy and allows both tighter binding and broader recognition of second-generation aminoglycosides, such as amikacin. Furthermore, we show that the mutations which are responsible for spectrum broadening induce a large structural change in the active site, which allows for the accommodation of an extended set of substrates.

RESULTS AND DISCUSSION

We have solved the crystal structures of both AAC(6')-Ib and AAC(6')-Ib_u. The narrow spectrum variant Ib was crystallized in complex with coenzyme A (structure solved to 1.8 Å resolution), or coenzyme A and kanamycin (2.4 Å resolution). Crystals of broad-spectrum variant Ib_u were obtained the absence of substrate (2.1 Å resolution). Interestingly, each variant failed to crystallize in the conditions used for the other one. Both variants

Correspondence to Frédéric Dardel
mail: frederic.dardel@univ-paris5.fr
Tel: +33 1 53 73 95 12
Fax: +33 1 53 73 99 25

share the same fold (Fig. 1B), which belongs to the GCN5-related *N*-acetyltransferase superfamily (Vetting *et al.*, 2005), also encompassing other classes of AAC. Accordingly, the acetyl-CoA binding site is structurally similar to that of other enzymes of this family. There are, however, important differences at the level of the antibiotic binding site, which will be discussed below.

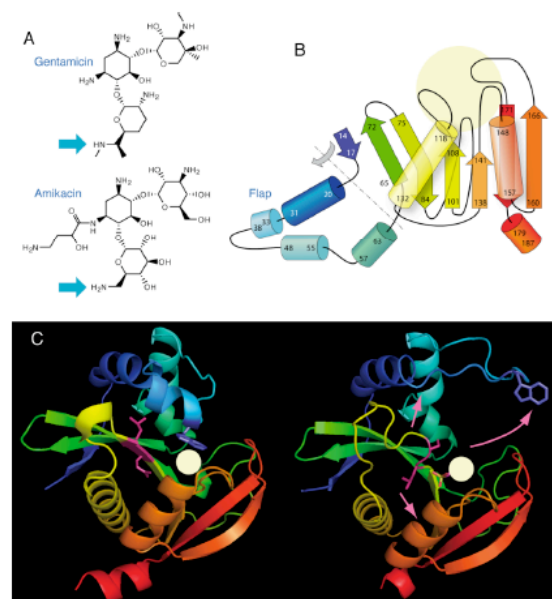


Fig 1 | Structure of AAC(6')-Ib and structural switch associated with broad-spectrum inducing substitutions. (A) Structure of gentamicin and amikacin. The amino groups which are acetylated are indicated by arrows. (B) Topology of AAC(6')-Ib. Residue numbers are indicated. The yellow disk indicates the location of the aminoglycoside binding pocket. The top of this pocket is closed by an alpha helical flap which folds back along the dashed axis, above the central b-sheet. (C) Structure of AAC(6')-Ib (left) and of its broad-spectrum variant AAC(6')-Ib₁₁ (right). Substituted residues are shown in purple. Pink arrows indicate movements of the flap and W38. Color coding is the same for panels B and C.

The two previously reported AAC(6') structures are obligate dimers, as their aminoglycoside binding crevice is shared between the two protomers (Vetting *et al.*, 2004; Wybenga-Groot *et al.*, 1999). On the contrary, AAC(6')-Ib is essentially monomeric: gel filtration experiments confirmed that AAC(6')-Ib and AAC(6')-Ib-cr are monomers in solution, whereas AAC(6')-Ib₁₁ exhibits a monomer/dimer equilibrium (not shown). Accordingly, the active site is contained within a single protomer, with the aminoglycoside binding site being constituted by connecting loops (Fig. 1B), a topology that differs from the previously reported structures. These loops form a closed pocket, in which the aminoglycoside fits snugly (Fig. 2A).

There is also a long α -helical flap forming a lid over the antibiotic pocket, with a loop contacting the aminoglycoside rings (Fig. 1B). This extended flap is specific of AAC(6')-Ib and is held in place by a stacking interaction between the side chains of W38 (in the flap) and N147 (in the core, Fig. 2B), creating a tunnel surrounding the end of the pantothenate arm of coenzyme A. This could explain the specific enzymatic behavior of AAC(6')-Ib, which exhibits an ordered kinetic mechanism, in which acetyl-CoA is the first substrate to bind (Kim *et al.*, 2007). Locking of the flap around acetyl-CoA could therefore position key residues involved in antibiotic recognition, such as W39, which stacks

onto the aminoglycoside ring I. Hence, prior binding of acetyl-CoA could facilitate subsequent recognition of the antibiotic.

AAC(6')-Ib has evolved the capacity to acetylate semi-synthetic aminoglycosides that carry a bulky *N*-substituent on the central ring, such as amikacin (Fig. 1A). There indeed exists a cavity on the surface of the active site that can accommodate such a chain (Fig. 2A). This binding pocket is absent in the active site of other, less efficient variants of AAC(6').

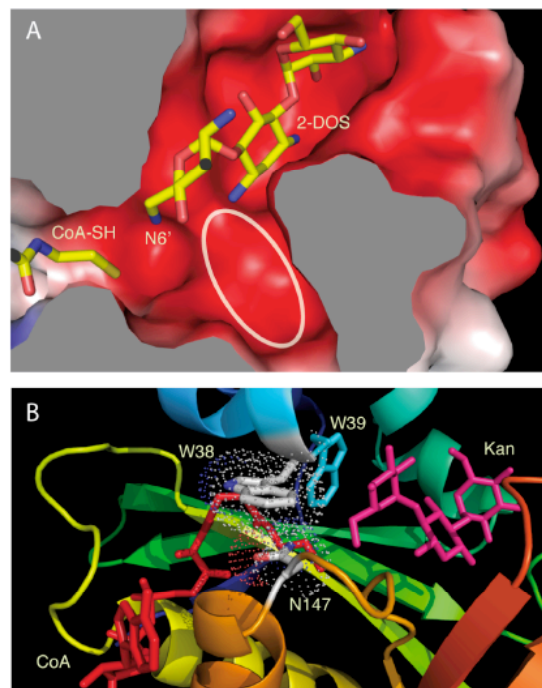


Fig 2. | Recognition of ligands. (A) structure of AAC(6')-Ib in complex with kanamycin. The solvent accessible surface is shown, colored as a function of the electrostatic surface potential. The oval contour highlight the crevice that could accommodate N3 substituents of 2-DOS, such as that present in amikacin. (B) Locking of the "flap" around coenzyme A. N146 is hydrogen bonded to the pantothenate arm and provides a stacking platform for the side chain of W38 in the flap. This contributes to position W39 which is part of the antibiotic binding pocket.

Mutations which confer a broadened spectrum to AAC(6')-Ib₁₁, Q106L and L107S (purple in Fig. 1C), are not located in the vicinity of the aminoglycoside site, but along the narrow groove that binds the pantothenate arm of acetyl-CoA. In AAC(6')-Ib₁₁, the double substitution induces a large structural change, caused by a disruption of the central b-strand (Fig. 1C). As a consequence, the packing of helices above and below the b-sheet is perturbed, causing a large scale "gaping" of the active site. As a result of this packing perturbation, the flap above the aminoglycoside pocket can no longer lock in place and undergoes the largest change, with W38 moving by as much as 15 Å. This results in a major increase in the accessible volume of the active site which could then possibly accommodate bulkier substrates with substituted amino groups. This might explain the dual specificity of this variant for gentamicin and amikacin.

AAC(6')-Ib₁₁, which was crystallized in the absence of substrate, serendipitously co-crystallized with one HEPES buffer molecule bound within the active site (Fig. 3B). Remarkably, the sulfonate group of HEPES lies over the position of the sulfur atom of

coenzyme A and the nitrogen atom of its piperazine ring sits at the site of the acetylable nitrogen of kanamycin. Using solution NMR, we observed direct saturation transfer from the protons of the enzyme to those of HEPES, confirming that HEPES is able to bind to AAC(6'), not only in crystals, but also in solution (see supplementary materials). Hence HEPES appears as a minimal transition state analog of the acetylation reaction (Fig. 3A) and could thus be used as a central scaffold for building effective inhibitors of AAC(6') enzymes.

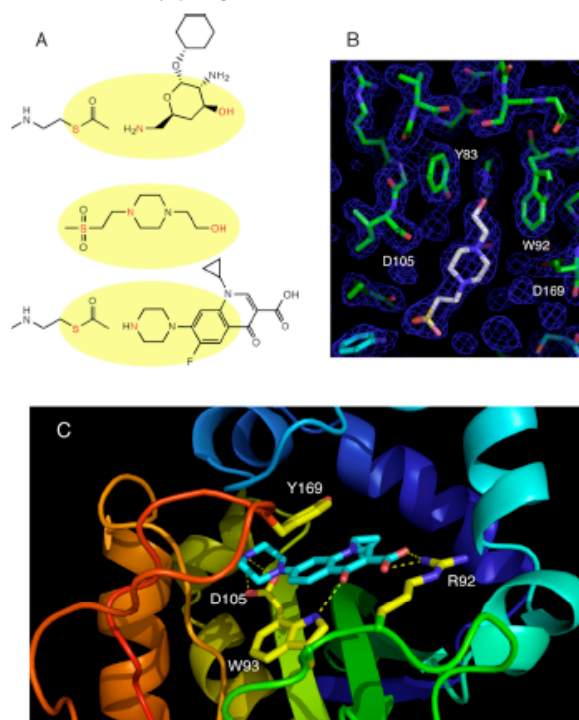


Fig 3 | Interaction of AAC(6')-Ib with ligands. (A) Comparison of ligand geometries : top acetyl-CoA and aminoglycoside; middle, HEPES; bottom, acetyl-CoA and ciprofloxacin. (B) 2 Fo-Fc electron density of HEPES bound in the active site of AAC(6')-Ib_{cr}, contoured at 2s. (C) refined model of ciprofloxacin bound to AAC(6')-Ib-cr, showing interactions with the two mutated residues, R92 and Y169 (same color coding as in Fig. 1).

Interestingly, one of the fluoroquinolones which AAC(6')-Ib-cr has evolved to recognize, ciprofloxacin, also contains a piperazine moiety (Fig. 3A) which is *N*-acetylated by the enzyme (Robicsek *et al.*, 2008b). The two substitutions which confer the new specificity to AAC(6')-Ib-cr, W92R and D169Y, are located in two exposed loops which form the backside of the antibiotic binding pocket (Fig. 1B). It appeared therefore straightforward to model the structure of AAC(6')-Ib-cr based on that of AAC(6')-Ib. The interaction with ciprofloxacin was investigated, using the structural similarity with HEPES to anchor the piperazine ring of the fluoroquinolones in the enzyme. The result of this modeling (Fig. 3C) shows the side-chains of the two substituted residues being in a position to form specific stabilizing interactions with ciprofloxacin: Y169 can stack on the quinolone heterocycle, while the guanidinium group of R92 can hydrogen bond to the keto or carboxy groups of the antibiotic.

In addition to the "gaping" capability of the active site, the specific scaffold of AAC(6')-Ib, in which recognition of the acetylable substrate is mediated by side-chains of exposed loops (as opposed to other AAC(6') enzymes), could provide the

structural plasticity required for adaptation to new antibiotics. This could explain in part why this isoform has been selected under the pressure of antibiotic usage and is now widely distributed among pathogens. Conversely, such a broad distribution makes AAC(6')-Ib an attractive target for countering drug resistance. The reported structures could help in guiding the design of novel aminoglycosides circumventing resistance. In addition, the observation that an original scaffold (piperazine ethane sulfonate) can mimic the transition state, could be an interesting lead for designing novel inhibitors.

METHODS

Plasmid construction and protein expression. AAC(6')-b_{cr} was originally identified in *Salmonella enterica* (Casin *et al.*, 2003). Its sequence was PCR amplified and cloned in pET101 (Invitrogen) and expressed in *E. coli* (Maurice *et al.*, 2006). This protein showed a significant propensity to aggregate and was expressed in inclusion bodies at growth temperatures above 20°C. We used a phenotypic screen to select for increased solubility. Transformed *E. coli* cells were streaked on LB plates containing kanamycin (50 µg/ml) and incubated at 37°C. Cells expressing soluble AAC(6')-Ib were able to grow normally as they could acetylate the antibiotic, whereas those expressing insoluble forms were selected against. After DNA sequencing, one such resistant variant was shown to carry a single nucleotide deletion in the stop codon. This results in a C-terminal extension of the protein by a hydrophilic tail of seven aminoacids, EGRAQFE (supplementary Fig. 1). This "tagged" variant proved to be stable and soluble. It was kept for further studies, as it is otherwise identical to the original AAC(6')-b_{cr} and shows a similar antibiotic selectivity (not shown). Purification of this protein was achieved as described (Maurice *et al.*, 2006). Expression vectors for wild type AAC(6')-Ib and variant AAC(6')-Ib-cr were derived by site-directed mutagenesis of the AAC(6')-Ib_{cr} vector (QuikChange, Stratagene).

Protein crystallization. Crystals of AAC(6')-Ib were grown at 18°C by the hanging-drop method from a solution containing 1.5M K₂HPO₄, 0.06M NaH₂PO₄, 0.1M guanidine-HCl and were reproduced by streak seeding. Crystals were stabilized in 15% glycerol, 1.6 M K₂HPO₄, 0.07 M NaH₂PO₄ before vitrification in liquid N₂. Crystals belong to space group P4₂2₂ with unit cell constants of $a = b = 57.62 \text{ \AA}$ and $c = 146.67 \text{ \AA}$.

Crystals of AAC(6')-Ib_{cr} and Se-Met-AAC(6')-Ib_{cr} were grown at 18 °C by the hanging-drop method by mixing equal volumes of protein (15 mg/ml) and reservoir solution (100 mM HEPES pH 7.5, 1.5 M Li₂SO₄, 3% isopropanol). Crystals belong to space group C222 with unit cell constant of $a = 71.62 \text{ \AA}$, $b = 85.37 \text{ \AA}$, and $c = 150.41 \text{ \AA}$.

Structure determination and refinement. A multiwavelength anomalous diffraction data set was collected on a Se-Met AAC(6')-Ib_{cr} crystal to 2.8 Å resolution on the BM30A beam line (ESRF, Grenoble). Datasets were collected at $\lambda = 0.9794 \text{ \AA}$ (inflexion), $\lambda = 0.9792 \text{ \AA}$ (peak) and $\lambda = 0.9278 \text{ \AA}$ (remote). They were integrated and scaled with XDS (Kabsch, 1993). Model building was done with Sharp and O (Jones *et al.*, 1991). A 2.1 Å resolution native dataset of AAC(6')-Ib_{cr} was also collected on ID14 (ESRF, Grenoble), the refinement was performed in CNS (Brunger *et al.*, 1998) (crystallographic parameters in supplementary table).

The structure of AAC(6')-Ib was solved with Phaser (Read, 2001) using the AAC(6')-Ib_{cr} as a molecular replacement model. The model was completed using iterative cycles of model building

and refinement in REFMAC (Winn *et al.*, 2001). Although not added in the crystallization solution, electron density due to bound CoA was observed, a situation previously reported for AAC(6')-Iy (Vetting *et al.*, 2004). The structure of the complex with kanamycin was obtained by diffusing the antibiotic into the crystals (1 to 1 ratio with the protein) and solving the structure similarly.

Completeness of the models was 173 out of 196 residues for both the AAC(6')-Ib and AAC(6')-Ib_{cr} structures. Density was missing for residues 1-10 and 184-196 in AAC(6')-Ib, and 1-11, 41-43 and 188-196 in AAC(6')-Ib_{cr}. The missing N- and C-terminal extensions are not part of the enzyme core. The C-terminal extension corresponds to the solubility tag, whereas the N-terminal extension originates from gene fusion (Casin *et al.*, 1998).

AAC(6')-Ib_{cr} crystals contain two monomers per asymmetric unit whereas the wild-type enzyme contains only one and is a true monomer in solution (not shown). The former observation could be related to the fact that AAC(6')-Ib_{cr} variant appears to be partially dimeric in gel filtration experiments (not shown). The protein-protein contact seen in the crystal structure of this protein differ from those observed in the structure of other AAC(6').

Coordinates have been deposited with the PDB (entries 2PRB, 2QIR and 2PR8).

Saturation transfer difference. NMR setup and saturation transfer difference experiments (Mayer & Meyer, 2001) using AAC(6')-Ib11 were performed as previously described (Maurice *et al.*, 2006; Tisne & Dardel, 2002).

Modeling the interaction with ciprofloxacin. Starting from the structure of wild-type AAC(6')-Ib, the two mutations (W92R and D169Y, suppl. Fig. 1) were introduced manually using Pymol (DeLano Scientific). The corresponding structure was energy minimized using X-PLOR-NIH (Schwieters *et al.*, 2003). Ciprofloxacin structure was generated using PRODRG (Schüttelkopf & van Aalten, 2004). Six different rotamers of ciprofloxacin were generated, by rotation about the piperazine-quinolone bond. They were then placed into the active site of AAC(6')-Ib_{cr}, by superimposing their piperazine ring onto that of HEPS in the structure of AAC(6')-Ib_{cr}, ignoring steric clashes. These six complexes were refined independently. Ca atoms of residues outside the active site (residues 12-38, 44-87, 95-163 and 174-187) were restrained by a harmonic potential, as well as the acetylable nitrogen of ciprofloxacin, in order to maintain the active site geometry. The complex was energy minimized and submitted to a restrained simulated annealing refinement. It consisted of 2 ps of dynamics at 1000 K followed by cooling to 100 K over 10 ps during which the harmonic restraints on the Ca atoms were gradually turned off. The resulting complexes were finally energy minimized.

Of the six resulting structures, two had poor energy scores and were discarded. The other four were very similar, with both rings of ciprofloxacin in comparable orientations. In some structures, the mutated residues (R92 and Y169) had come in contact with the ligand, suggesting they contributed directly to binding. In order to model these interactions, we submitted the four structures to an additional short restrained molecular dynamics refinement (5 ps at 100K followed by minimization). We added distance restraints, forcing the guanidinium of R92 and the ring of Y169 to contact ciprofloxacin. This resulted in structures in which R92 contacted the oxo or carboxy oxygen of ciprofloxacin, while Y169 stacked on top of the quinolone. All four structures were similar and had good stereochemistry. The best structure is shown in figure 3C. Overall, formation of the complex between

AAC(6')-Ib_{cr} and ciprofloxacin does not seem to require major structural rearrangements as the r.m.s.d between AAC(6')-Ib and our model of AAC(6')-Ib_{cr} is about 1 Å for Ca.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Drs. Claudine Mayer and Sabrina Biarrotte-Sorin for initial advice on structure determination. FM is supported by a scholarship from the French Ministry of research and higher education.

REFERENCES

- Brooks BR, Brucoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M (1983) Charmm - a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J Comp Chem* 4: 187-217
- Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54: 905-921
- Casin I, Bordon F, Bertin P, Coutrot A, Podglajen I, Brasseur R, Collatz E (1998) Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase variants of the Ib type with altered substrate profile in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 209-215
- Casin I, Hanau-Bercot B, Podglajen I, Vahaboglu H, Collatz E (2003) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bla(PEP-1)-carrying plasmid pST11 encodes an extended-spectrum aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of type Ib. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 697-703
- Fluit AC, Schmitz FJ (2004) Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 10: 272-288
- Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard M (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* 47: 110-119
- Kabsch W (1993) Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *J Appl Cryst* 26: 795-800
- Kim C, Villegas-Estrada A, Hesk D, Mobashery S (2007) Mechanistic Characterization of the Bifunctional Aminoglycoside-Modifying Enzyme AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 46: 5270-5282
- Magnet S, Lambert T, Courvalin P, Blanchard JS (2001) Kinetic and Mutagenic Characterization of the Chromosomally Encoded *Salmonella enterica* AAC(6')-Iy Aminoglycoside N-Acetyltransferase. *Biochemistry* 40: 3700-3709
- Maurice F, Bégis B, Micouin L, Dardel F (2006) NMR Identification of ligands of aminoglycoside resistance enzymes. *C R Chimie* 9: 413-419
- Mayer M, Meyer B (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* 123: 6108-6117
- Read RJ (2001) Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 1373-1382
- Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC (2006a) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 6: 629-640
- Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC (2006b) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12: 83-88

- Schuttelkopf AW, van Aalten DM (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 1355-1363
- Schwieters CD, Kuszewski JJ, Tjandra N, Clore GM (2003) The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J Magn Reson* 160: 65-73
- Tisne C, Dardel F (2002) Optimisation of a Peptide library for screening specific RNA ligands by flow-injection NMR. *Comb Chem High Throughput Screen* 5: 523-529.
- Tran Van Nhieu G, Collatz E (1987) Primary structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase AAC(6')-4, fused in vivo with the signal peptide of the Tn3-encoded beta-lactamase. *J Bacteriol* 169: 5708-5714
- Vakulenko SB, Mobashery S (2003) Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 16: 430-450
- Vetting MW, LP SdC, Yu M, Hegde SS, Magnet S, Roderick SL, Blanchard JS (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* 433: 212-226
- Vetting MW, Magnet S, Nieves E, Roderick SL, Blanchard JS (2004) A bacterial acetyltransferase capable of regioselective N-acetylation of antibiotics and histones. *Chem Biol* 11: 565-573
- Winn MD, Isupov MN, Murshudov GN (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 122-133
- Wright GD, Ladak P (1997) Overexpression and Characterization of the Chromosomal Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase from *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 956-960
- Wybenga-Groot LE, Draker K, Wright GD, Berghuis AM (1999) Crystal structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase: defining the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily fold. *Structure* 7: 497-507

Structural bases of emerging antibiotic resistance

BIBLIOGRAPHIE

Agnelli, F., S. J. Sucheck, K. A. Marby, D. Rabuka, S. L. Yao, P. S. Sears, F. S. Liang and C. H. Wong (2004). "Dimeric aminoglycosides as antibiotics." *Angew Chem Int Ed Engl* **43**(12): 1562-6.

Ali, B. H. (1995). "Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research." *Gen Pharmacol* **26**(7): 1477-87.

Allen, N. E., W. E. Alborn, Jr., J. N. Hobbs, Jr. and H. A. Kirst (1982). "7-Hydroxytropolone: an inhibitor of aminoglycoside-2"-O-adenylyltransferase." *Antimicrob Agents Chemother* **22**(5): 824-31.

Barluenga, S., K. B. Simonsen, E. S. Littlefield, B. K. Ayida, D. Vourloumis, G. C. Winters, M. Takahashi, S. Shandrick, Q. Zhao, Q. Han and T. Hermann (2043). "Rational design of azepane-glycoside antibiotics targeting the bacterial ribosome." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **14**: 713-718.

Bates, D. E. (2003). "Aminoglycoside ototoxicity." *Drugs Today (Barc)* **39**(4): 277-85.

Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris and M. Turck (1966). "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method." *Am J Clin Pathol* **45**(4): 493-6.

Begg, E. J. and M. L. Barclay (1995). "Aminoglycosides--50 years on." *Br J Clin Pharmacol* **39**(6): 597-603.

Benveniste, R. and J. Davies (1973). "Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(8): 2276-80.

Boehr, D. D., S. I. Jenkins and G. D. Wright (2003). "The molecular basis of the expansive substrate specificity of the antibiotic resistance enzyme aminoglycoside acetyltransferase-6'-aminoglycoside phosphotransferase-2". The role of ASP-99 as an active site base important for acetyl transfer." *J Biol Chem* **278**(15): 12873-80.

Bonin, M., C. Bournaud, F. Dardel, F. Maurice, L. Micouin, C. Tisné and A. Perez-Luna (2004). "Analogues d'aminoglycosides, leur utilisation et leur synthèse., Brevet français n°0408574 du 03/08/2004 CNRS/Université Paris 5, extension internationale n°PCT/FR05/02025."

Brenner, S. (1987). "Phosphotransferase sequence homology." *Nature* **329**(6134): 21.

Brunger, A. T., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson and G. L. Warren (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**(Pt 5): 905-21.

Bryan, L. E., K. O'Hara and S. Wong (1984). "Lipopolysaccharide changes in impermeability-type aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **26**(2): 250-5.

Burk, D. L., N. Ghuman, L. E. Wybenga-Groot and A. M. Berghuis (2003). "X-ray structure of the AAC(6')-II antibiotic resistance enzyme at 1.8 Å resolution; examination of oligomeric arrangements in GNAT superfamily members." *Protein Sci* **12**(3): 426-37.

Burk, D. L., B. Xiong, C. Breitbach and A. M. Berghuis (2005). "Structures of aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-Ii in a novel crystal form: structural and normal-mode analyses." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**(Pt 9): 1273-9.

Busscher, G. F., S. Groothuys, R. de Gelder, F. P. Rutjes and F. L. van Delft (2004). "Efficient preparation of a 1,3-diazidocyclitol as a versatile 2-deoxystreptamine precursor." *J Org Chem* **69**(13): 4477-81.

Carlier, C. and P. Courvalin (1990). "Emergence of 4',4"-aminoglycoside nucleotidyltransferase in enterococci." *Antimicrob Agents Chemother* **34**(8): 1565-9.

Carter, A. P., W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly and V. Ramakrishnan (2000). "Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics." *Nature* **407**(6802): 340-8.

Casin, I., B. Hanau-Bercot, I. Podglajen, H. Vahaboglu and E. Collatz (2003). "Salmonella enterica serovar Typhimurium bla(PER-1)-carrying plasmid pSTI1 encodes an extended-spectrum aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of type Ib." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(2): 697-703.

Centron, D. and P. H. Roy (2002). "Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(5): 1402-9.

Chen, A. and M. J. Shapiro (1998). "NOE pumping : A Novel NMR Technique for Identification of Compounds with Binding Affinity to Macromolecules." *J Am Chem Soc* **120**: 10258-10259.

Chen, A. and M. J. Shapiro (2000). "A High-Throughput method to Determine Compounds with Binding Affinity to Macromolecules by NMR." *J Am Chem Soc* **122**: 414-415.

Choutet, P. (2003). "[Antibiotic use: excesses and consequences]." *Rev Prat* **53**(14): 1527-32.

Chung, F., C. Tisne, T. Lecourt, F. Dardel and L. Micouin (2007). "NMR-guided fragment-based approach for the design of tRNA(Lys3) ligands." *Angew Chem Int Ed Engl* **46**(24): 4489-91.

Cundliffe, E. (1989). "How antibiotic-producing organisms avoid suicide." *Annu Rev Microbiol* **43**: 207-33.

Daigle, D. M., D. W. Hughes and G. D. Wright (1999). "Prodigious substrate specificity of AAC(6')-APH(2''), an aminoglycoside antibiotic resistance determinant in enterococci and staphylococci." *Chem Biol* **6**(2): 99-110.

Daigle, D. M., G. A. McKay and G. D. Wright (1997). "Inhibition of aminoglycoside antibiotic resistance enzymes by protein kinase inhibitors." *J Biol Chem* **272**(40): 24755-8.

Davies, J. (2007). "Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria." *EMBO Rep* **8**(7): 616-21.

Delano, W. L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System.

Denis, F., M. Privat de Garhile, P. Trieu-Cuot, P. Courvalin and M. C. Ploy (2001). *Antibiotiques*.

- Deresinski, S.** (2006). "Antistaphylococcal vaccines and immunoglobulins: current status and future prospects." *Drugs* **66**(14): 1797-806.
- Deurenberg, R. H., C. Vink, S. Kalenic, A. W. Friedrich, C. A. Bruggeman and E. E. Stobberingh** (2007). "The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Clin Microbiol Infect* **13**(3): 222-35.
- DiGiammarino, E. L., K. A. Draker, G. D. Wright and E. H. Serpersu** (1998). "Solution studies of isepamicin and conformational comparisons between isepamicin and butirosin A when bound to an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase determined by NMR spectroscopy." *Biochemistry* **37**(11): 3638-44.
- Draker, K. A., D. B. Northrop and G. D. Wright** (2003). "Kinetic mechanism of the GCN5-related chromosomal aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-II from *Enterococcus faecium*: evidence of dimer subunit cooperativity." *Biochemistry* **42**(21): 6565-74.
- Dubois, V., L. Poirel, C. Marie, C. Arpin, P. Nordmann and C. Quentin** (2002). "Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(3): 638-45.
- Dyda, F., D. C. Klein and A. B. Hickman** (2000). "GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**: 81-103.
- Emsley, P. and K. Cowtan** (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-32.
- Ennifar, E., J. C. Paillart, S. Bernacchi, P. Walter, P. Pale, J. L. Decout, R. Marquet and P. Dumas** (2007). "A structure-based approach for targeting the HIV-1 genomic RNA dimerization initiation site." *Biochimie*.
- Escaich, S.** (2006). "A new therapeutic approach for the treatment of severe infections." *DrugPlus international*.
- Fong, D. H. and A. M. Berghuis** (2002). "Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry." *Embo J* **21**(10): 2323-31.
- Forge, A. and J. Schacht** (2000). "Aminoglycoside antibiotics." *Audiol Neurotol* **5**(1): 3-22.
- Fourmy, D., M. I. Recht, S. C. Blanchard and J. D. Puglisi** (1996). "Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic." *Science* **274**(5291): 1367-71.
- Francois, B., R. J. Russell, J. B. Murray, F. Aboul-ela, B. Masquida, Q. Vicens and E. Westhof** (2005). "Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding." *Nucleic Acids Res* **33**(17): 5677-90.
- Franklin, K. and A. J. Clarke** (2001). "Overexpression and characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase of *Providencia stuartii*." *Antimicrob Agents Chemother* **45**(8): 2238-44.
- French, G. L.** (2005). "Clinical impact and relevance of antibiotic resistance." *Adv Drug Deliv Rev* **57**(10): 1514-27.

Fujimura, S., Y. Tokue, H. Takahashi, T. Kobayashi, K. Gomi, T. Abe, T. Nukiwa and A. Watanabe (2000). "Novel arbekacin- and amikacin-modifying enzyme of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *FEMS Microbiol Lett* **190**(2): 299-303.

Galimand, M., P. Courvalin and T. Lambert (2003). "Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(8): 2565-71.

Gao, F., X. Yan, O. M. Baettig, A. M. Berghuis and K. Auclair (2005). "Regio- and chemoselective 6'-N-derivatization of aminoglycosides: bisubstrate inhibitors as probes to study aminoglycoside 6'-N-acetyltransferases." *Angew Chem Int Ed Engl* **44**(42): 6859-62.

Gao, F., X. Yan, T. Shakya, O. M. Baettig, S. Ait-Mohand-Brunet, A. M. Berghuis, G. D. Wright and K. Auclair (2006). "Synthesis and structure-activity relationships of truncated bisubstrate inhibitors of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferases." *J Med Chem* **49**(17): 5273-81.

Grundmann, H., M. Aires-de-Sousa, J. Boyce and E. Tiemersma (2006). "Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat." *Lancet* **368**(9538): 874-85.

Haddad, J., L. P. Kotra, B. Llano-Sotelo, C. Kim, E. F. Azucena, Jr., M. Liu, S. B. Vakulenko, C. S. Chow and S. Mobashery (2002). "Design of novel antibiotics that bind to the ribosomal acyltransfer site." *J Am Chem Soc* **124**(13): 3229-37.

Haddad, J., S. B. Vakulenko and S. Mobashery (1999). "An antibiotic cloaked by its own resistance enzyme." *J Am Chem Soc* **121**: 11922-11923.

Hancock, R. E. (1984). "Alterations in outer membrane permeability." *Annu Rev Microbiol* **38**: 237-64.

Hanlon, G. W. (2007). "Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections." *Int J Antimicrob Agents* **30**(2): 118-28.

Hatch, R. A. and N. L. Schiller (1998). "Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **42**(4): 974-7.

Hegde, S. S., F. Javid-Majd and J. S. Blanchard (2001). "Overexpression and mechanistic analysis of chromosomally encoded aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase (AAC(2')-Ic) from *Mycobacterium tuberculosis*." *J Biol Chem* **276**(49): 45876-81.

Hermann, T. and E. Westhof (1998). "Aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme: a general model for the interaction of cationic antibiotics with RNA." *J Mol Biol* **276**(5): 903-12.

Hermann, T. and E. Westhof (1999). "Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds." *J Med Chem* **42**(7): 1250-61.

Hoffman, L. R., D. A. D'Argenio, M. J. MacCoss, Z. Zhang, R. A. Jones and S. I. Miller (2005). "Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation." *Nature* **436**(7054): 1171-5.

Holm, L. and C. Sander (1995). "DNA polymerase beta belongs to an ancient nucleotidyltransferase superfamily." *Trends Biochem Sci* **20**(9): 345-7.

- Hopfield, J. J.** (1974). "Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**(10): 4135-9.
- Hwang, T., Shaka, A.J.** (1995). "Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms Pulsed-Field Gradients." *Journal of Magnetic Resonance* **112**(2): 275-279.
- Ida, T., R. Okamoto, M. Nonoyama, K. Irinoda, M. Kurazono and M. Inoue** (2002). "Antagonism between aminoglycosides and beta-lactams in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate involves induction of an aminoglycoside-modifying enzyme." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(5): 1516-21.
- Inoue, M., M. Nonoyama, R. Okamoto and T. Ida** (1994). "Antimicrobial activity of arbekacin, a new aminoglycoside antibiotic, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Drugs Exp Clin Res* **20**(6): 233-9.
- Jones, T. A., J. Y. Zou, S. W. Cowan and M. Kjeldgaard** (1991). "Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models." *Acta Crystallogr A* **47** (Pt 2): 110-9.
- Kabsch, W.** (1993). "Automatic indexing of rotation diffraction patterns." *J. Appl. Cryst.* **26**: 795-800.
- Kadurugamuwa, J. L., A. J. Clarke and T. J. Beveridge** (1993). "Surface action of gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **175**(18): 5798-805.
- Kim, C., J. Haddad, S. B. Vakulenko, S. O. Meroueh, Y. Wu, H. Yan and S. Mobashery** (2004). "Fluorinated aminoglycosides and their mechanistic implication for aminoglycoside 3'-phosphotransferases from Gram-negative bacteria." *Biochemistry* **43**(9): 2373-83.
- Kim, C., D. Hesek, J. Zajicek, S. B. Vakulenko and S. Mobashery** (2006). "Characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme ANT(3'')-II/AAC(6'')-IId from *Serratia marcescens*." *Biochemistry* **45**(27): 8368-77.
- Kim, C., A. Villegas-Estrada, D. Hesek and S. Mobashery** (2007). "Mechanistic characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-Ib/AAC(6'')-Ib' from *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochemistry* **46**(17): 5270-82.
- Kondo, S. and K. Hotta** (1999). "Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: Development and enzymatic modifications." *J Infect Chemother* **5**(1): 1-9.
- Kondo, S., K. Iinuma, H. Yamamoto, Y. Ikeda and K. Maeda** (1973). "Letter: Synthesis of (S)-4-amino-2-hydroxybutyryl derivatives of 3',4'-dideoxykanamycin B and their antibacterial activities." *J Antibiot (Tokyo)* **26**(11): 705-7.
- Lambert, T., M. C. Ploy and P. Courvalin** (1994). "A spontaneous point mutation in the aac(6'')-Ib' gene results in altered substrate specificity of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of a *Pseudomonas fluorescens* strain." *FEMS Microbiol Lett* **115**(2-3): 297-304.
- Le, S. Y., A. Siddiqui and J. V. Maizel, Jr.** (1996). "A common structural core in the internal ribosome entry sites of picornavirus, hepatitis C virus, and pestivirus." *Virus Genes* **12**(2): 135-47.

- Leigh, D. A., K. Bradnock and J. M. Marriner** (1981). "Augmentin (amoxycillin and clavulanic acid) therapy in complicated infections due to beta-lactamase producing bacteria." *J Antimicrob Chemother* **7**(3): 229-36.
- Lindahl, E., C. Azuara, P. Koehl and M. Delarue NOMAD-Ref : Visualisation, deformation and refinement of macromolecular structures based on all-atom normal mode analysis. .
- Lipsitch, M., R. S. Singer and B. R. Levin** (2002). "Antibiotics in agriculture: when is it time to close the barn door?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 5752-4.
- Liu, M., J. Haddad, E. Azucena, L. P. Kotra, M. Kirzhner and S. Mobashery** (2000). "Tethered bisubstrate derivatives as probes for mechanism and as inhibitors of aminoglycoside 3'-phosphotransferases." *J Org Chem* **65**(22): 7422-31.
- Lovering, A. M., L. O. White and D. S. Reeves** (1987). "AAC(1): a new aminoglycoside-acetylating enzyme modifying the Cl aminogroup of apramycin." *J Antimicrob Chemother* **20**(6): 803-13.
- Lynch, S. R. and J. D. Puglisi** (2001). "Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes." *J Mol Biol* **306**(5): 1037-58.
- Magnet, S. and J. S. Blanchard** (2005). "Molecular insights into aminoglycoside action and resistance." *Chem Rev* **105**(2): 477-98.
- Magnet, S., T. Lambert, P. Courvalin and J. S. Blanchard** (2001). "Kinetic and mutagenic characterization of the chromosomally encoded *Salmonella enterica* AAC(6')-Iy aminoglycoside N-acetyltransferase." *Biochemistry* **40**(12): 3700-9.
- Mah, T. F., B. Pitts, B. Pellock, G. C. Walker, P. S. Stewart and G. A. O'Toole** (2003). "A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance." *Nature* **426**(6964): 306-10.
- Mayer, M. and B. Meyer** (2001). "Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor." *J Am Chem Soc* **123**(25): 6108-17.
- Mei, H. Y., M. Cui, A. Heldsinger, S. M. Lemrow, J. A. Loo, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen and A. W. Czarnik** (1998). "Inhibitors of protein-RNA complexation that target the RNA: specific recognition of human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA by small organic molecules." *Biochemistry* **37**(40): 14204-12.
- Mendes, R. E., M. A. Toleman, J. Ribeiro, H. S. Sader, R. N. Jones and T. R. Walsh** (2004). "Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, blaIMP-16, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene aac(6')-30/aac(6')-Ib': report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(12): 4693-702.
- Michael, K., H. Wang and Y. Tor** (1999). "Enhanced RNA binding of dimerized aminoglycosides." *Bioorg Med Chem* **7**(7): 1361-71.
- Miller, G. H., F. J. Sabatelli, R. S. Hare, Y. Glupczynski, P. Mackey, D. Shlaes, K. Shimizu and K. J. Shaw** (1997). "The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups." *Clin Infect Dis* **24 Suppl 1**: S46-62.
- Mingeot-Leclercq, M. P. and P. M. Tulkens** (1999). "Aminoglycosides: nephrotoxicity." *Antimicrob Agents Chemother* **43**(5): 1003-12.

- Nathan, C. and F. M. Goldberg** (2005). "Outlook: the profit problem in antibiotic R&D." *Nat Rev Drug Discov* **4**(11): 887-91.
- Navaza, J.** (1994). "AMoRe : an automated package for molecular replacement." *Acta Crystallogr., A Found. Crystallogr.* **50**: 157-163.
- Neu, H. C.** (1992). "The crisis in antibiotic resistance." *Science* **257**(5073): 1064-73.
- Nobuta, K., M. E. Tolmasky, L. M. Crosa and J. H. Crosa** (1988). "Sequencing and expression of the 6'-N-acetyltransferase gene of transposon Tn1331 from *Klebsiella pneumoniae*." *J Bacteriol* **170**(8): 3769-73.
- Nurizzo, D., S. C. Shewry, M. H. Perlin, S. A. Brown, J. N. Dholakia, R. L. Fuchs, T. Deva, E. N. Baker and C. A. Smith** (2003). "The crystal structure of aminoglycoside-3'-phosphotransferase-IIa, an enzyme responsible for antibiotic resistance." *J Mol Biol* **327**(2): 491-506.
- Ogle, J. M., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter and V. Ramakrishnan** (2001). "Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit." *Science* **292**(5518): 897-902.
- Over, U., D. Gur, S. Unal and G. H. Miller** (2001). "The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey." *Clin Microbiol Infect* **7**(9): 470-8.
- Pape, T., W. Wintermeyer and M. V. Rodnina** (2000). "Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome." *Nat Struct Biol* **7**(2): 104-7.
- Paterson, D. L.** (1999). "Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin--a review of current knowledge." *Commun Dis Intell* **23**(3): 69-73.
- Payie, K. G. and A. J. Clarke** (1997). "Characterization of gentamicin 2'-N-acetyltransferase from *Providencia stuartii*: its use of peptidoglycan metabolites for acetylation of both aminoglycosides and peptidoglycan." *J Bacteriol* **179**(13): 4106-14.
- Pedersen, L. C., M. M. Benning and H. M. Holden** (1995). "Structural investigation of the antibiotic and ATP-binding sites in kanamycin nucleotidyltransferase." *Biochemistry* **34**(41): 13305-11.
- Perez Luna, A., M. A. Ceschi, M. Bonin, L. Micouin, H. P. Husson, S. Gougeon, G. Estenne-Bouhtou, B. Marabout, M. Sevrin and P. George** (2002). "Enantioselective desymmetrization of meso bicyclic hydrazines: a novel approach to the asymmetric synthesis of polysubstituted amino cyclopentanic cores." *J Org Chem* **67**(10): 3522-4.
- Perrakis, A., R. Morris and V. S. Lamzin** (1999). "Automated protein model building combined with iterative structure refinement." *Nat Struct Biol* **6**(5): 458-63.
- Pervushin, K., R. Riek, G. Wider and K. Wuthrich** (1997). "Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12366-71.
- Piepersberg W, D. J., Heinzl P, Perz-Gonzalez J** (1988). "Antibiotic resistance by modification : many resistance genes could be derived from cellular control genes in Actinomycetes. A hypothesis." *Actinomycetologica* **2**: 83-98.

- Pourreza, A., M. Witherspoon, J. Fox, J. Newmark, D. Bui and M. E. Tolmasky** (2005). "Mutagenesis analysis of a conserved region involved in acetyl coenzyme A binding in the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib encoded by plasmid pJHCMW1." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(7): 2979-82.
- Powell, H. R.** (1999). "The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**(Pt 10): 1690-5.
- Powers, T. and H. F. Noller** (1991). "A functional pseudoknot in 16S ribosomal RNA." *Embo J* **10**(8): 2203-14.
- Putman, M., H. W. van Veen and W. N. Konings** (2000). "Molecular properties of bacterial multidrug transporters." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4): 672-93.
- Radek, K. and R. Gallo** (2007). "Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system." *Semin Immunopathol* **29**(1): 27-43.
- Rather, P. N.** (1998). "Origins of the aminoglycoside modifying enzymes." *Drug Resist Updat* **1**(5): 285-91.
- Rather, P. N., H. Munayyer, P. A. Mann, R. S. Hare, G. H. Miller and K. J. Shaw** (1992). "Genetic analysis of bacterial acetyltransferases: identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase Ib and IIa proteins." *J Bacteriol* **174**(10): 3196-203.
- Rather, P. N., E. Orosz, K. J. Shaw, R. Hare and G. Miller** (1993). "Characterization and transcriptional regulation of the 2'-N-acetyltransferase gene from *Providencia stuartii*." *J Bacteriol* **175**(20): 6492-8.
- Read, R. J.** (2001). "Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**(Pt 10): 1373-82.
- Robicsek, A., G. A. Jacoby and D. C. Hooper** (2006). "The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance." *Lancet Infect Dis* **6**(10): 629-40.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush and D. C. Hooper** (2006). "Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase." *Nat Med* **12**(1): 83-8.
- Roestamadji, J., I. L. Grapsas and S. Mobashery** (1995). "Mechanism-Based Inactivation of Bacterial Aminoglycoside 3'-Phosphotransferases." *J Am Chem Soc* **117**: 80-84.
- Roselle, G. A., R. Bode, B. Hamilton, M. Bibler, R. Sullivan, R. Douce, J. L. Staneck and W. E. Bullock** (1985). "Clinical trial of the efficacy and safety of ticarcillin and clavulanic acid." *Antimicrob Agents Chemother* **27**(3): 291-6.
- Schlutzen, F., A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi and A. Yonath** (2000). "Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution." *Cell* **102**(5): 615-23.
- Schmidt, F. R., E. J. Nucken and R. B. Henschke** (1988). "Nucleotide sequence analysis of 2"-aminoglycoside nucleotidyl-transferase ANT(2") from Tn4000: its relationship with AAD(3") and impact on Tn21 evolution." *Mol Microbiol* **2**(6): 709-17.
- Schwieters, C. D., J. J. Kuszewski, N. Tjandra and G. M. Clore** (2003). "The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package." *J Magn Reson* **160**(1): 65-73.

- Skeggs, P. A., J. Thompson and E. Cundliffe** (1985). "Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of *Streptomyces lividans* carrying DNA from *Streptomyces tenjimariensis*." *Mol Gen Genet* **200**(3): 415-21.
- Slee, A. M., M. A. Wuonola, R. J. McRipley, I. Zajac, M. J. Zawada, P. T. Bartholomew, W. A. Gregory and M. Forbes** (1987). "Oxazolidinones, a new class of synthetic antibacterial agents: in vitro and in vivo activities of DuP 105 and DuP 721." *Antimicrob Agents Chemother* **31**(11): 1791-7.
- Smith, C. A. and E. N. Baker** (2002). "Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation." *Curr Drug Targets Infect Disord* **2**(2): 143-60.
- Smith, D. L., A. D. Harris, J. A. Johnson, E. K. Silbergeld and J. G. Morris, Jr.** (2002). "Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 6434-9.
- Stahl, J. P.** (2006). "[Epidemiology, control and treatments of antimicrobial resistances: highlights of the 45th ICAAC, Washington, 2005]." *Med Mal Infect* **36**(5): 290-6.
- Stein, G. E.** (2005). "Antimicrobial resistance in the hospital setting: impact, trends, and infection control measures." *Pharmacotherapy* **25**(10 Pt 2): 44S-54S.
- Sunada, A., M. Nakajima, Y. Ikeda, S. Kondo and K. Hotta** (1999). "Enzymatic 1-N-acetylation of paromomycin by an actinomycete strain #8 with multiple aminoglycoside resistance and paromomycin sensitivity." *J Antibiot (Tokyo)* **52**(9): 809-14.
- Taber, H. W., J. P. Mueller, P. F. Miller and A. S. Arrow** (1987). "Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics." *Microbiol Rev* **51**(4): 439-57.
- Thompson, P. R., J. Schwartzenhauer, D. W. Hughes, A. M. Berghuis and G. D. Wright** (1999). "The COOH terminus of aminoglycoside phosphotransferase (3')-IIIa is critical for antibiotic recognition and resistance." *J Biol Chem* **274**(43): 30697-706.
- Tor, Y., T. Hermann and E. Westhof** (1998). "Deciphering RNA recognition: aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme." *Chem Biol* **5**(11): R277-83.
- Tran van Nhieu, G. and E. Collatz** (1987). "Primary structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase AAC(6')-4, fused in vivo with the signal peptide of the Tn3-encoded beta-lactamase." *J Bacteriol* **169**(12): 5708-14.
- Udou, T., Y. Mizuguchi and R. J. Wallace, Jr.** (1989). "Does aminoglycoside-acetyltransferase in rapidly growing mycobacteria have a metabolic function in addition to aminoglycoside inactivation?" *FEMS Microbiol Lett* **48**(2): 227-30.
- Vakulenko, S. B. and S. Mobashery** (2003). "Versatility of aminoglycosides and prospects for their future." *Clin Microbiol Rev* **16**(3): 430-50.
- Veber, B., G. Demeilliers and I. Aimé** (1999). *Place des aminoglycosides en anesthésie-réanimation*, Paris, Elsevier, SFAR.
- Vetting, M. W., S. S. Hegde, F. Javid-Majd, J. S. Blanchard and S. L. Roderick** (2002). "Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with coenzyme A and aminoglycoside substrates." *Nat Struct Biol* **9**(9): 653-8.

- Vetting, M. W., S. d. C. LP, M. Yu, S. S. Hegde, S. Magnet, S. L. Roderick and J. S. Blanchard** (2005). "Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases." *Arch Biochem Biophys* **433**(1): 212-26.
- Vetting, M. W., S. Magnet, E. Nieves, S. L. Roderick and J. S. Blanchard** (2004). "A bacterial acetyltransferase capable of regioselective N-acetylation of antibiotics and histones." *Chem Biol* **11**(4): 565-73.
- Vicens, Q. and E. Westhof** (2001). "Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site." *Structure* **9**(8): 647-58.
- Vicens, Q. and E. Westhof** (2002). "Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site." *Chem Biol* **9**(6): 747-55.
- Walker, J. B. and M. Skorvaga** (1973). "Phosphorylation of streptomycin and dihydrostreptomycin by Streptomyces. Enzymatic synthesis of different diphosphorylated derivatives." *J Biol Chem* **248**(7): 2435-40.
- Walsh, C.** (2003). *Antibiotics actions, origins, resistance*, ASM Press.
- Wang, M., J. H. Tran, G. A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang and D. C. Hooper** (2003). "Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Escherichia coli from Shanghai, China." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(7): 2242-8.
- Webb, V. and J. Davies** (1993). "Antibiotic preparations contain DNA: a source of drug resistance genes?" *Antimicrob Agents Chemother* **37**(11): 2379-84.
- Welch, K. T., K. G. Virga, N. A. Whittemore, C. Ozen, E. Wright, C. L. Brown, R. E. Lee and E. H. Serspersu** (2005). "Discovery of non-carbohydrate inhibitors of aminoglycoside-modifying enzymes." *Bioorg Med Chem* **13**(22): 6252-63.
- Williams, J. W. and D. B. Northrop** (1978). "Substrate specificity and structure-activity relationships of gentamicin acetyltransferase I. The dependence of antibiotic resistance upon substrate V_{max}/K_m values." *J Biol Chem* **253**(17): 5908-14.
- Williams, J. W. and D. B. Northrop** (1979). "Synthesis of a tight-binding, multisubstrate analog inhibitor of gentamicin acetyltransferase I." *J Antibiot (Tokyo)* **32**(11): 1147-54.
- Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch and V. Ramakrishnan** (2000). "Structure of the 30S ribosomal subunit." *Nature* **407**(6802): 327-39.
- Winn, M. D., M. N. Isupov and G. N. Murshudov** (2001). "Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**(Pt 1): 122-33.
- Wolf, E., A. Vassilev, Y. Makino, A. Sali, Y. Nakatani and S. K. Burley** (1998). "Crystal structure of a GCN5-related N-acetyltransferase: Serratia marcescens aminoglycoside 3-N-acetyltransferase." *Cell* **94**(4): 439-49.
- Wybenga-Groot, L. E., K. Draker, G. D. Wright and A. M. Berghuis** (1999). "Crystal structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase: defining the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily fold." *Structure Fold Des* **7**(5): 497-507.

Yu, L., T. K. Oost, J. M. Schkeryantz, J. Yang, D. Janowick and S. W. Fesik (2003). "Discovery of aminoglycoside mimetics by NMR-based screening of Escherichia coli A-site RNA." *J Am Chem Soc* **125**(15): 4444-50.

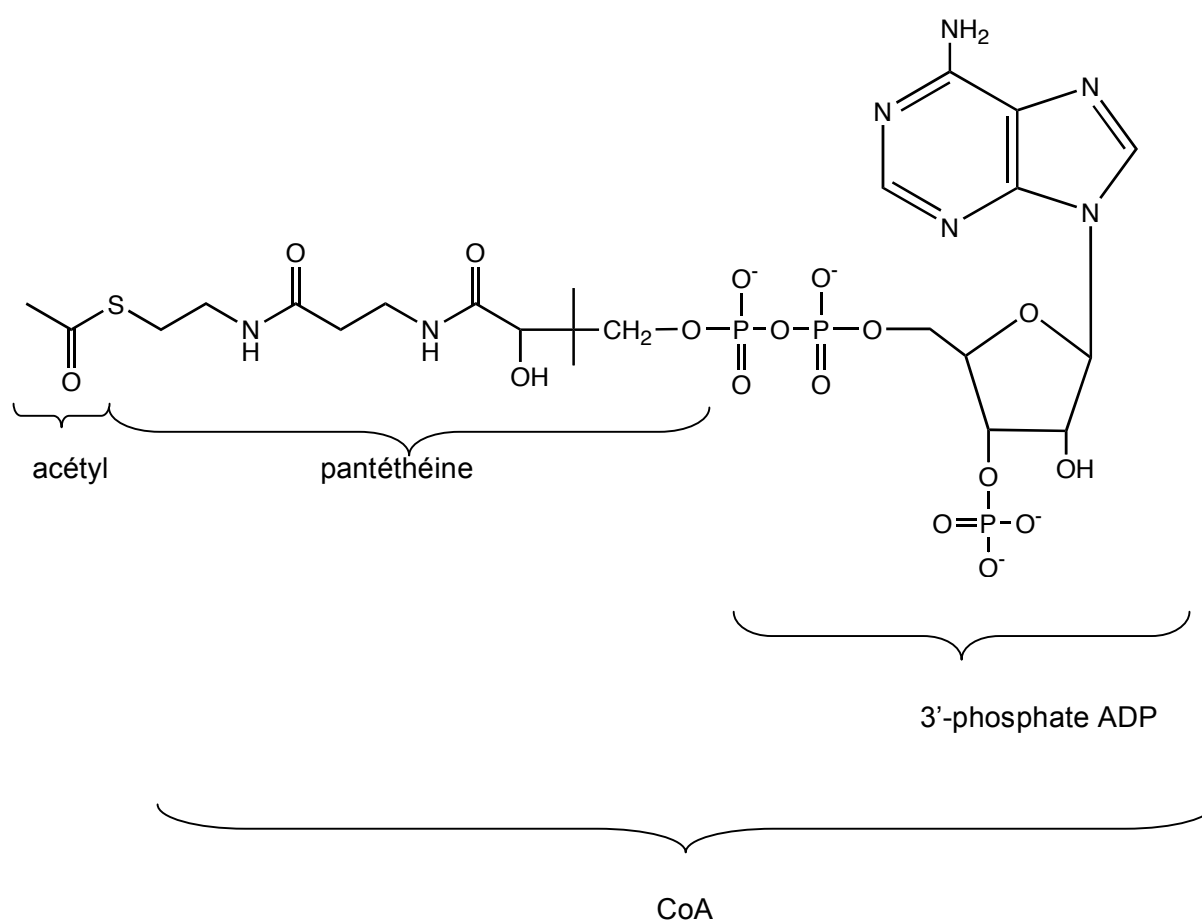
Zapp, M. L., S. Stern and M. R. Green (1993). "Small molecules that selectively block RNA binding of HIV-1 Rev protein inhibit Rev function and viral production." *Cell* **74**(6): 969-78.

Zerbe, O. (2003). *BioNMR in drug research*, WILEY-VCH.

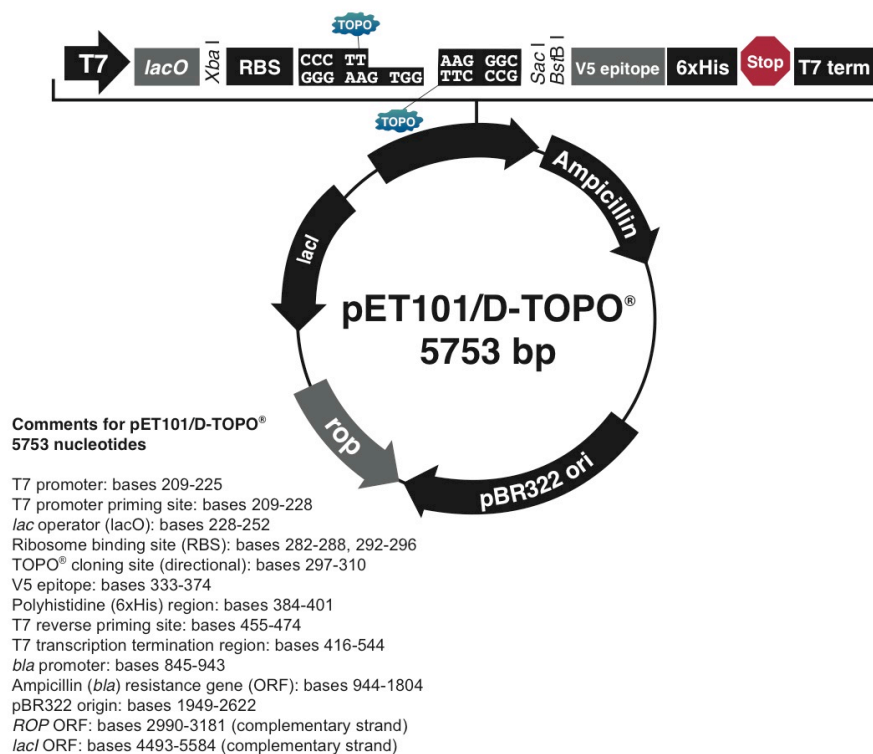
Zhou Y., G. V. E., Sun Z., Ayida B.K., Winters G.C., Murphy D., Simonsen K.B., Vourloumis D., Fish S., Froelich J.M., Wall D., Hermann T., (2005). "Structure-guided discovery of novel aminoglycoside mimetics as antibacterial translation inhibitors." *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4942-4949.

Zhou Y., S. Z., Froelich J.M., Hermann T., Wall D. (2006). "Structure-activity relationships of novel antibacterial translation inhibitors: 3,5-Diamino-piperidiny triazines." *Bioorg Med Chem Lett* **16**: 5451-5456.

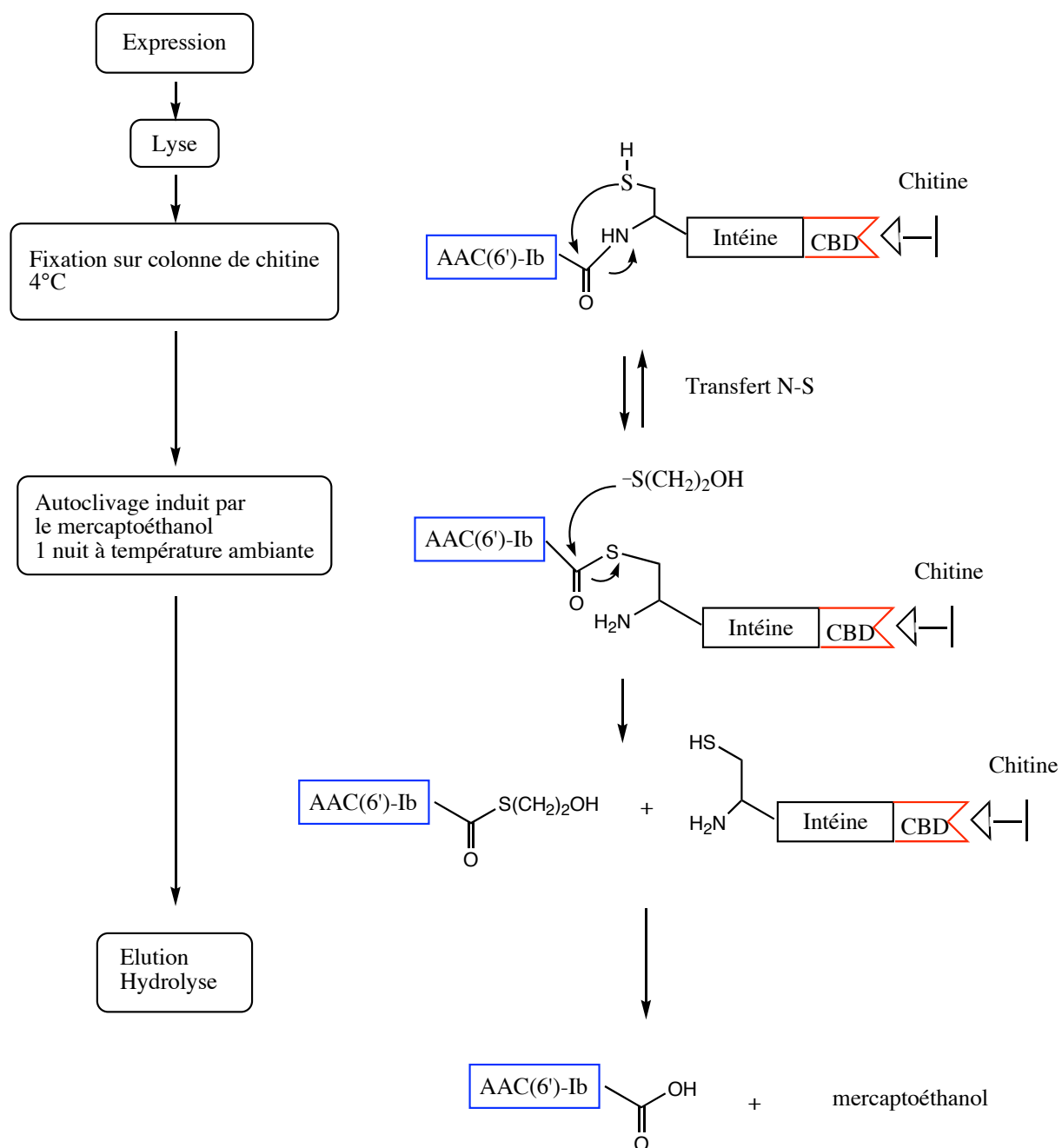
ANNEXES

Annexe 1 : Structure de l'acétyl coenzyme A (acétyl-CoA)

Annexe 2 : Plasmide

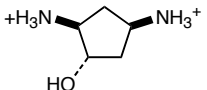
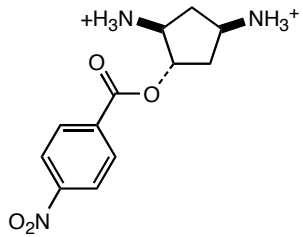
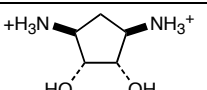
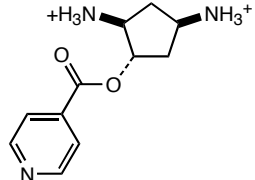
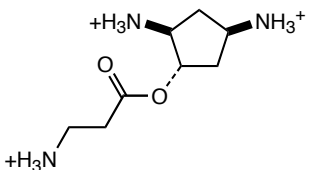
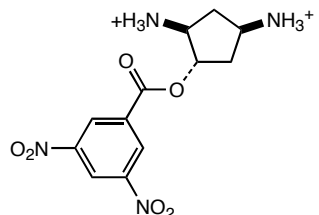
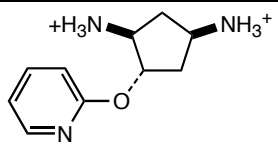
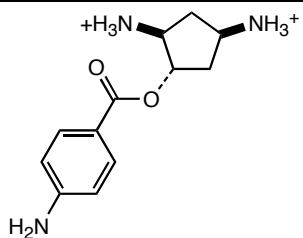
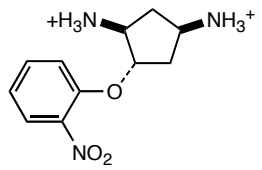
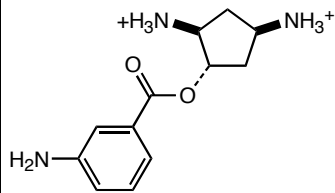
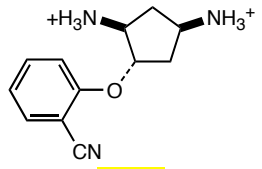
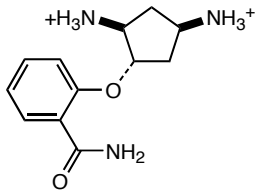


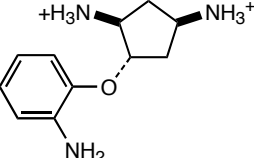
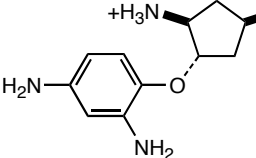
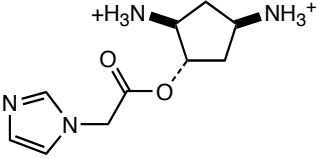
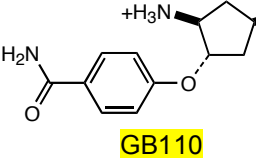
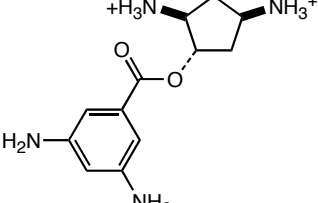
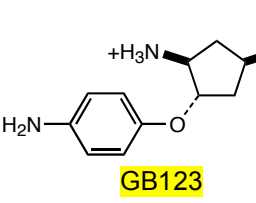
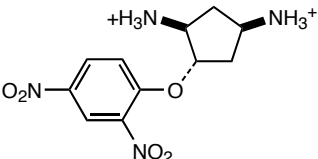
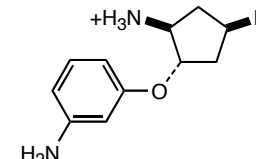
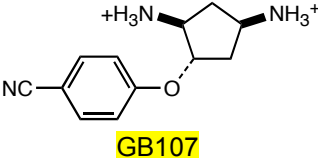
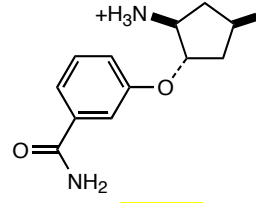
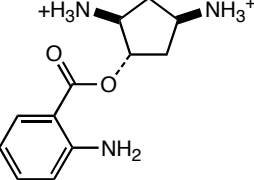
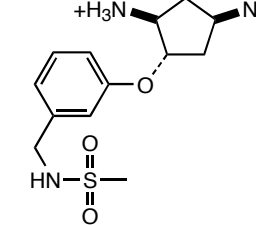
Annexe 3 : Système de purification IMPACT

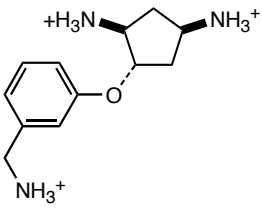
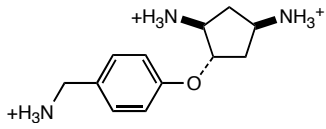
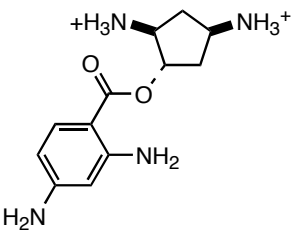
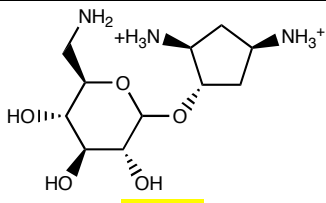
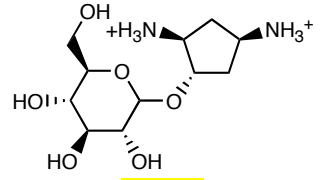


CBD : Chitine binding site

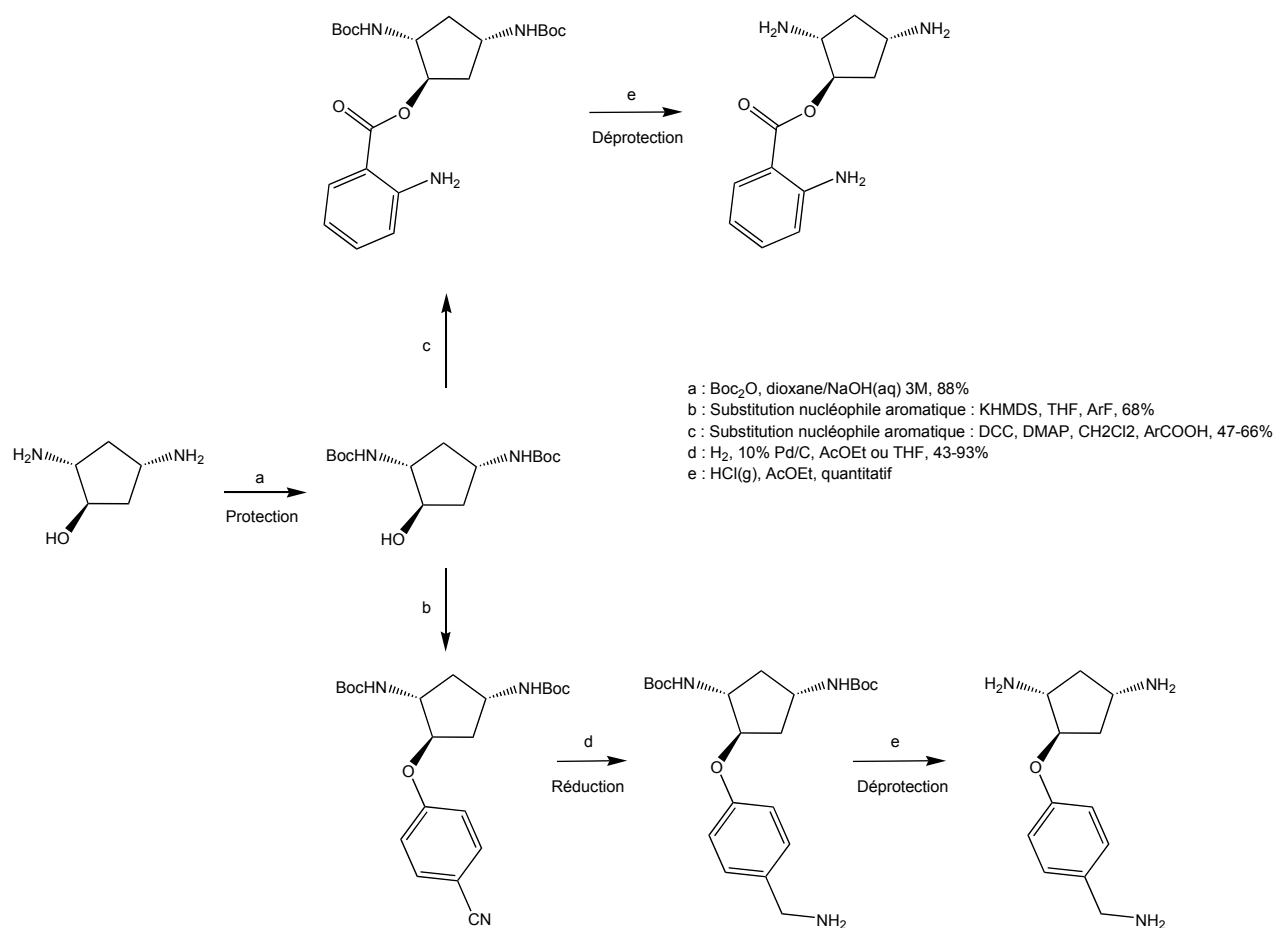
Annexe 4 : Récapitulatif du criblage par RMN sur l'enzyme, des mesures d'affinités par fluorescence et du criblage d'activité antibiotique pour les molécules dérivées du DACP synthétisées. (n. d. = non déterminé)

| Structure / Nom | Affinité pour l'AAC(6')-Ib ₁₁ | effet antibio-tique | Structure / Nom | Affinité pour l'AAC(6')-Ib ₁₁ | effet antibio-tique |
|--|---|---------------------|---|---|---------------------|
|  DACP | Fixation RMN : + K _d Fluo : 41 μM | n.d. |  GB59 | Fixation RMN : - | non |
|  CB182 | n.d. | n.d. |  GB60 | Fixation RMN : - - | non |
|  RS29 | Fixation RMN : + | n.d. |  GB61 | Fixation RMN : - | non |
|  GB49 | Fixation RMN : ± | Non |  GB64 | Fixation RMN : + | non |
|  GB50 | Fixation RMN : + K _d fluo : 23 μM | Non |  GB65 | Fixation RMN : ± K _d fluo : 57 μM | non |
|  GB51 | Fixation RMN : ++ | Non |  GB67 | Fixation RMN : +++ | non |

| Structure / Nom | Affinité pour l'AAC(6')-Ib ₁₁ | effet antibiotique | Structure / Nom | Affinité pour l'AAC(6')-Ib ₁₁ | effet antibiotique |
|---|---|--------------------|--|--|--------------------|
|  GB68 | Fixation RMN : + | non |  GB109 | Fixation RMN : - | oui |
|  GB70 | Fixation RMN : - | non |  GB110 | Fixation RMN : +++ | non |
|  GB71 | Fixation RMN : + | non |  GB123 | Fixation RMN : - | non |
|  GB103 | Fixation RMN : - - | non |  GB126 | Fixation RMN : - | non |
|  GB107 | Fixation RMN : +++ K _d fluo : 20 μM | non |  GB138 | Fixation RMN : +++ | non |
|  GB108 | Fixation RMN : - | non |  GB165 | Fixation RMN : + | non |

| Structure / Nom | Affinité pour l'AAC(6')-Ib ₁₁ | effet antibiotique |
|--|---|--------------------|
|  GB167 | Fixation RMN : ++ Substrat de l'enzyme (+) | non |
|  GB169 | Fixation RMN : ++ Substrat de l'enzyme (++) K _d fluo : 25 µM | non |
|  GB210 | n. d | non |
|  GB211 | K _d fluo : 4 µM | non |
|  GB212 | K _d non mesurable par fluo | non |

Annexe 5 : Voie de synthèse des dérivés du DACP



Plasticité structurale et émergence d'antibiorésistance à large spectre : étude d'une aminoglycoside acétyl transférase et recherche d'inhibiteurs.

La résistance aux antibiotiques apparaît aujourd'hui comme un problème majeur de santé publique, en particulier à cause de l'apparition de souches de bactéries multirésistantes par production d'enzymes de modification de ces antibiotiques. Nous avons étudié une de ces enzymes de résistance, l'AAC(6')-Ib conférant la résistance aux aminoglycosides, antibiotiques à large spectre utilisés principalement en milieu hospitalier pour lutter contre des infections sévères. Deux variants de cette enzyme se sont répandus dans les souches cliniques résistantes : le premier confère une résistance élargie à tous les aminoglycosides, le second confère une résistance élargie à une autre classe d'antibiotiques, les fluoroquinolones. Nous avons résolu la structure de l'enzyme sauvage et du premier variant par cristallographie aux rayons X. Nous avons également modélisé la structure du deuxième variant. Ces structures nous ont permis d'apporter une explication possible sur l'adaptation de cette enzyme aux différents antibiotiques. En parallèle, nous avons réalisé un criblage de ligands de cette enzyme par RMN à flux continu robotisé. Nous avons pu isoler plusieurs motifs se fixant dans le site actif de l'enzyme constituant des pistes intéressantes dans la conception d'inhibiteurs de l'activité enzymatique.

Mots clés : Résistance bactérienne, acétyltransférase, antibiotiques, aminoglycosides, fluoroquinolones, criblage, cristallographie, RMN.

Enzyme structure plasticity and emergence of broad spectrum antibiotic resistance : study of an aminoglycoside acetyltransferase and inhibitor design.

The emergence of multi-resistant pathogenic bacteria is a worldwide health issue. Recently, clinical variants of a single antibiotic-modifying acetyltransferase, AAC(6')-Ib, have appeared that confer extended resistance to most aminoglycosides and, more surprisingly, to structurally unrelated fluoroquinolones. The corresponding gene is carried by mobile genetic elements and is present in most multi-resistant pathogenic strains, hence making it a serious threat to current therapies. We report the crystal structures of both narrow and broad-spectrum resistance variants of this enzyme, which reveal the structural basis for the emergence of extended resistance. The active site displays an important plasticity and has adapted to new substrates by a large-scale gaping process. We have also obtained co-crystals with both substrates, as well as with a simple transition state analog, which provides new clues for the design of inhibitors of this resistance mechanism.

Key words : bacterial resistance, antibiotic, aminoglycoside, fluoroquinolone, acetyltransferase, screening, crystallography, NMR.